

BIOTEKNOLOGI PELESTARIAN PLASMA NUTFAH

Koordinator : Harmastini
Anggota : H. Karsono
Kusmiati
R. Melliawati

PENDAHULUAN

Dalam upaya menunjang program Hutan Tanaman Industri telah dilaksanakan penelitian pelestarian plasma nutfah yang meliputi penelitian Rhizobium dan Mikoriza secara hayati dengan serangkaian kegiatan eksplorasi lapangan ke berbagai lokasi di Indonesia guna mengumpulkan material penelitian. Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. mendapatkan isolat Rhizobium unggul yang mampu hidup bersimbiosa dan menambat N_2 udara secara optimal dengan tanaman hutan terpilih, *Paraserianthes falcataria* dan *Acacia mangium*. Dari isolat terpilih dipelajari produksi biomasnya dengan menggunakan fermentor berkapasitas 15 liter.
2. mendapatkan isolat cendawan ektomikoriza dari akar *Pinus merkusii* dan
3. inokulasi VAM pada *A. mangium*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan berupa bintil akar diperoleh sebagai hasil eksplorasi lapangan ke daerah Jawa Barat, Riau, Bengkulu, dan Kalimantan Timur (Samarinda dan Kabupaten Kutai). Akar *P. merkusii* diperoleh dari daerah Aceh.

ISOLASI

Isolasi bakteri Rhizobium dari sampel bintil akar dilakukan dengan cara yang dipertelakan oleh Somasegaran dan Hoben (1985). Isolat-isolat yang telah dimurnikan disimpan pada medium YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) (Vincent, 1970) dan pemeliharaannya dilakukan dengan pemindahan secara terus-menerus pada waktu-waktu tertentu.

Akar *P. merkusii* dicuci dengan air dan tween 20 untuk menghilangkan partikel tanah yang menempel. Akar yang sudah

bersih dipotong-potong berukuran 1 cm, disterilkan dengan larutan H₂O₂ dan dibilas dengan akuades 5-6 kali. Kemudian akar dikeringkan pada kertas tisu steril dan diletakkan pada plate Melin-Norkrans (MMN) serta diinkubasi pada suhu kamar.

KARAKTERISASI

Untuk menguji kepastian bahwa isolat hasil isolasi tersebut benar biak Rhizobium, terhadap isolat-isolat tersebut dilakukan uji pertumbuhan pada beberapa media selektif, yakni media YEMA dengan penambahan indikator Congo Red, Brom Thymol Blue dan Brilliant Green. Selain itu isolat-isolat tersebut juga ditumbuhkan pada media Pepton Glukosa Agar guna melihat kemampuannya dalam menggunakan sumber N Pepton. (Somasegaran, 1984).

Pengelompokan isolat-isolat Rhizobium dilakukan dengan cara melihat pola ketahanannya terhadap beberapa antibiotika. Dalam hal ini dipakai 3 jenis antibiotika dengan dua taraf konsentrasi. Pola ketahanan tersebut dibandingkan dengan pola yang ditampilkan oleh biak referensi, USDA 110 dan CB 756.

AUTENTIKASI

Uji autentikasi terhadap isolat-isolat hasil isolasi dalam kemampuannya membentuk bintil akar pada tanaman penguji siratro (*Macroptilium atropurpureum*) dilakukan dengan metoda tabung tegak (Saono dkk. 1975). Biji Siratro setelah disterilisasi permukaan dengan menggunakan chlorox% dikecambahkan selama 2 malam. Kemudian kecambah siratro steril ditanam dalam tabung yang berisi medium semi solid steril. Suspensi isolat Rhizobium dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan pada kecambah tersebut. Perlakuan juga disertai tanaman kontrol yaitu kecambah yang tidak ditetesi dengan suspensi bakteri. Selain itu dibuat pula perlakuan pertabung kecambah siratro pada media semi solid yang mengandung unsur N dalam jumlah cukup. Tiap perlakuan dibuat dengan 3 ulangan dan lama percobaan adalah satu bulan. Pengamatan pembentukan bintil akar dapat dilihat mulai tanaman berumur 2 minggu sampai saat dipanen.

Pengujian autentikasi dilanjutkan pada tanaman inangnya yakni *A. mangium* dan *P. falcataria* dengan menggunakan "Leonard

Jar". Bagian atas dari Leonard Jar diisi dengan pasir laut steril dan bagian bawahnya diisi dengan larutan hara tanaman (Saono dkk, 1975). Penanaman kecambah dan inokulasi bakteri dilakukan dengan cara seperti telah diuraikan di atas. Masing-masing Leonard Jar ditanam dengan 3 kecambah, kemudian diinokulasi dengan suspensi bakteri (10^9 sel/ml). Setelah tanaman berumur 2 minggu. Satu dari tiga kecambah yang ditanam, satu tanaman dicabut dan dua ditinggalkan. Tiap perlakuan dibuat dengan 3 ulangan dan lama percobaan adalah tiga bulan. Pengamatan dilakukan dengan melihat pembentukan dan jumlah bintil akar, kandungan N tanaman yang ditunjukkan oleh biomasa tanaman bagian atas dan bagian bawah.

PRODUKSI BIOMASA

Produksi biomasa bakteri dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media hidrolisat pati singkong. Media tersebut dihasilkan dari proses hidrolisa pati singkong oleh kapang amilolitik terpilih, *Aspergillus awamori*. Pengamatan dilakukan dengan melihat pertumbuhan bakteri pada interval waktu tertentu. Pertumbuhan tersebut diamati dengan metoda Miles and Misra (Somasegaran, 1984) dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada medium YEMA + CR. Lama pertumbuhan dalam fermentor adalah 10 hari. Setelah itu suspensi bakteri siap dipakai sebagai inokulan untuk menunjang pertumbuhan tanaman. Isolat yang diujikan saat ini adalah isolat asal tanaman *P. falcataria* (AS-1). Evaluasi penggunaan inokulan hasil perbanyakan di dalam fermentor dilakukan terhadap tanaman *P. falcataria* pada medium pasir steril di rumah kaca.

INOKULASI VAM PADA *A. mangium*

Biji *A. mangium* yang telah berkecambah diinokulasikan dengan spora *Gigaspora margarita* sebanyak 30 spora per 350 gram medium. Medium yang digunakan adalah Zeolit, pasir dan campuran tanah dan pasir (1:1). Percobaan diulangi sebanyak 5 kali. Parameter yang diamati adalah tinggi tanaman (cm), bobot kering daun (gram), dan persentase infeksi VAM pada akar serta jumlah spora per gram medium.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah koleksi isolat *Rhizobium* yang terkumpul sampai saat ini adalah 46 isolat asal tanaman *A. mangium* dan 50 isolat asal tanaman *P. falcataria* (Tabel 1). Sedangkan jumlah koleksi bintil akar yang berhasil dikumpulkan dari berbagai lokasi di Indonesia adalah 27 nomor asal *P. falcataria* dan 31 nomor asal tanaman *A. mangium* (Tabel 2).

Karakterisasi isolat *Rhizobium* yang telah dilakukan adalah pertumbuhan isolat tersebut pada medium selektif (4 macam) dan resistensinya terhadap 3 jenis antibiotika. Jumlah isolat yang telah diuji dari tanaman akasia adalah 17 isolat. Sedangkan dari tanaman albisia adalah 10 isolat.

Hasil yang didapat menunjukkan bahwa pertumbuhan 17 isolat *Rhizobium* asal tanaman akasia dan 10 isolat asal tanaman albisia semua tumbuh subur dan tidak menyerap warna merah dari Congo Red. Delapan isolat *Rhizobium* asal tanaman akasia termasuk kelompok tumbuh cepat yang ditunjukkan oleh adanya reaksi asam (warna kuning) pada medium YEMA + BTB. Sembilan isolat *Rhizobium* tanaman akasia dan 10 isolat *Rhizobium* tanaman albisia termasuk kelompok tumbuh lambat yang ditunjukkan oleh adanya reaksi basa (warna biru) (Tabel 3).

Pertumbuhan isolat *Rhizobium* asal tanaman akasia dan 9 isolat asal tanaman albisia pada medium Peptone Glukosa Agar, merana yang berarti bahwa isolat-isolat tersebut tidak mampu tumbuh dengan pepton sebagai sumber N nya. Sedangkan 6 isolat tanaman akasia dan 1 isolat tanaman albisia tumbuh subur pada medium dengan sumber N, peptone.

Pola ketahanan isolat-isolat tersebut terhadap 3 jenis antibiotika dengan 2 taraf konsentrasi memberikan adanya 3 pola ketahanan yang berbeda-beda dari isolat tanaman akasia dan 6 pola ketahanan dari isolat tanaman albisia (Tabel 4).

Autentikasi ke 27 isolat *Rhizobium* yang diuji terhadap tanaman penguji siratro dengan metoda tabung tegak, semua isolat mampu membentuk bintil akar. Sedangkan pengujian terhadap tanaman inangnya sampai saat ini baru selesai dengan 17 isolat *Rhizobium* terhadap tanaman akasia. Hasil sementara menunjukkan bahwa ke 17 isolat yang diuji, mampu bersimbiosa dan membentuk bintil akar

dengan tanaman akasia, hal ini ditunjang pula dengan jumlah bintil akar pertanaman (Tabel 5).

Sedangkan pengujian terhadap tanaman albisia sampai saat ini masih berlangsung.

Pertumbuhan isolat *Rhizobium* (AS-1) dalam medium hidrolisat pati pada fermentor berkapasitas 15 liter menunjukkan bahwa pada umur 10 hari jumlah bakteri yang tumbuh dapat mencapai 1.5×10^8 sel per ml.

Dari penelitian Mikoriza dapat dilaporkan hasil isolasi 1 isolat cendawan dari akar *P. merkusii* tetapi perbanyakkan isolat ini pada medium MMN cair belum berhasil walaupun telah dilakukan inkubasi hingga 6 minggu dalam shaker inkubator. Kendala mengenai perbanyakkan cendawan ini masih dipelajari. Sedangkan percobaan inokulasi VAM pada *A. mangium* masih terus dilakukan dan hasilnya akan dilaporkan kemudian.

Tabel 1. Isolat *Rhizobium* asal tanaman *Acacia mangium* dan *Paraserianthes falcataria*

Tanaman	Asal daerah	Jumlah isolat
<i>Paraserianthes falcataria</i>	Depok	5
	Bojong	2
	Situ Sari	2
	Pandeglang	9
	Purwakarta (Cikampek)	11
	Bandung Selatan	10
	Sukabumi (Parung Kuda)	6
	Cibinong	5
<i>Acacia mangium</i>	Depok	7
	Karawang	4
	Purwakarta	2
	Cikampek	6
	Serpong	3
	Serang	3
Riau	4	

Tabel 2. Koleksi bintil akar asal tanaman *Acacia mangium* dan *Paraserianthes falcataria* dari berbagai lokasi

Tanaman	Asal daerah	Jumlah isolat
<i>Paraserianthes falcataria</i>	Bengkulu	8
	Kaltim (Kutai)	8
	Kaltim (Samarinda)	1
	Kaltim	10
<i>Acacia mangium</i>	Bengkulu	7
	Kaltim (Kutai)	6
	Kaltim (samarinda)	8
	Kaltim	10
	Serang	3
	Raiu	4

Tabel 3. Pertumbuhan isolat Rhizobium asal tanaman akasia pada media selektif antibiotika

No.	Kode isolat	YEMA	YEMA+BTB	YEMA+CR	YEMA+PGA
1.	AMCB I 1	+	biru	merah muda	++
2.	AMCB I 2	++	biru	merah muda	++
3.	AMCB I 3	++	biru	merah muda	+
4.	AMCB I 4	++	biru	merah muda	+
5.	AMCB II 1	+	biru	merah muda	+
6.	AMCB III 1	++++	kuning	merah muda	+++
7.	AMCB III 2	+++	kuning	merah muda	+
8.	AMCB III 3	+	biru	merah muda	+
9.	AMCB III 4	+	biru	merah muda	+
10.	AMCB IV 1	+++	biru	merah muda	+
11.	AMCB V 1	+++	kuning	kuning muda	++
12.	AMCB V 2	+++	biru	putih kotor	++
13.	AMCB VI 1	++	kuning	merah muda	+
14.	AMCB VI 2	++	kuning	merah muda	+
15.	AMCB VI 3	+++	kuning	merah muda	+
16.	AMCB VI 4	+++	kuning	merah muda	+
17.	AMCB VI 5	+++	kuning	merah muda	+

Tabel 4. Hasil pengujian isolat Rhizobium asal akasia dengan antibiotik

Kode isolat	Spectomycin				Rifamycin				Streptomycin			
	100 µg/ml		250 µg/ml		100 µg/ml		250 µg/ml		125 µg/ml		312,5 µg/ml	
1. AMCB I1	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
2. AMCB I2	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
3. AMCB I3	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
4. AMCB I4	+	+	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
5. AMCB III1	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
6. AMCB III1	++	++	+	+	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
7. AMCB III2	++	-	+	+	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-
8. AMCB III3	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+	-	-
9. AMCB III4	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+	-	-
10. AMCB IV 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. AMCB V 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. AMCB V 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. AMCB VI1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. AMCB VI2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
15. AMCB VI3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. AMCB VI4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. AMCB VI5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18. USDA 110	+	-	+	-	++++	++++	++++	++	-	-	-	-

Tabel 5. Autentikasi isolat Rhizobium asal tanaman akasia pada tanaman Macroptilium

No.	Kode isolat	Pembentukan bintil			
		Pot I		Pot II	
1.	AMCB I 1	+	+	+	+
2.	AMCB I 2	+	-	+	+
3.	AMCB I 3	+	+	+	-
4.	AMCB I 4	-	-	+	+
5.	AMCB II 1	+	+	+	+
6.	AMCB III 1	+	+	-	-
7.	AMCB III 2	+	-	+	-
8.	AMCB III 3	+	+	+	+
9.	AMCB III 4	+	+	+	+
10.	AMCB IV 1	-	-	-	+
11.	AMCB V 1	+	+	+	+
12.	AMCB V 2	+	+	+	+
13.	AMCB VI 1	-	-	+	-
14.	AMCB VI 2	-	-	-	-
15.	AMCB VI 3	+	-	+	-
16.	AMCB VI 4	-	-	-	-
17.	AMCB VI 5	+	-	-	-
18.	KO	-	-	-	-
19.	KNO	-	-	-	-
20.	USDA 110	+	+	+	+

BAFTAR PUSTAKA

Bomasegaran, P. and H.J. Hoben, 1985. Methods in Legumes. Rhizobium Technology. University of Hawaii Niftal.

Saono, S., H. Karsono and S. Abdulkadir, 1975. Notes on the nodulation of Some Edible Legumes of Indonesia. Annales Bogoriences, VI(1) : 27-41

Vincent, J.M. 1970. A manual for the Practical. Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No.15. Black well Scient.Publ., Oxford and Edinburgh.