

KOMPETISI ANTARA 2 BAKTERI *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* DALAM PEMBENTUKAN BINTIL AKAR TANAMAN KEDELE

Setiyo Hadi Waluyo

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan
Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

KOMPETISI ANTARA 2 BAKTERI *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* DALAM PEMBENTUKAN BINTIL AKAR TANAMAN KEDELE. Beberapa percobaan Rhizotron telah dilakukan untuk mempelajari kompetisi antara *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 110SB (mutan tahan antibiotik) dan strain 106 pada tanah masam dari Sitiung, Sumatra pada tanaman kedele varietas Tidar dan 23D. Pelet biji kedele dengan CaCO_3 dan $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$ dilakukan untuk meningkatkan pembentukan bintil akar. Bakteri dalam bintil akar diidentifikasi dengan mutan bakteri tahan antibiotik dan REP-PCR. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pelet biji dapat meningkatkan secara nyata jumlah bintil akar yaitu dari 5 buah menjadi 9 dan 15 karena pelet biji dengan CaCO_3 dan $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$. Demikian juga dengan berat basah bintil akar yang meningkat dari hanya 85 mg pada kontrol menjadi 171 mg pada CaCO_3 dan 360 mg pada $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$. Berdasarkan pertumbuhan bakteri pada media antibiotik dan REP-PCR, hasilnya menunjukkan bahwa bakteri strain USDA 110SB mampu membentuk bintil akar lebih banyak yaitu 87 dan 98,7 persen dari pada strain 106, yaitu hanya 13 dan 1,3 persen masing-masing pada tanaman kedele var Tidar dan 23D. Penambahan jumlah bakteri 106 sampai dengan 4 kali lebih besar dari jumlah bakteri strain USDA 110SB tidak dapat meningkatkan prosentase jumlah bintil akar dari bakteri 106. Pengunduran waktu inokulasi juga tidak dapat merubah pola kompetisi dari 2 bakteri tersebut. Hasil ini menunjukkan bahwa untuk suksesnya inokulasi bakteri BA untuk meningkatkan fiksasi N secara hayati diperlukan adanya bakteri yang efektif dan mempunyai daya saing yang tinggi untuk membentuk bintil akar. Hal ini sangat penting karena budidaya tanaman kedele secara kontinyu dapat menyebabkan jumlah bakteri BA meningkat dan hal ini akan mengganggu introduksi bakteri BA yang baru.

Kata Kunci : Kompetisi, *Bradyrhizobium japonicum*, Mutan antibiotik, REP-PCR, Kedele

ABSTRACT

Some Rhizotron experiments were conducted to study competition between two *Bradyrhizobium japonicum* strains, USDA 110SB and 106 in acid soil, Sitiung, Sumatra on soybean plant Tidar and 23D varieties. CaCO_3 and $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$ were added as seed pellet to increase nodules formation. Antibiotic resistant mutant and REP-PCR were used to identify bacteria occupying the nodules. It was shown that application of CaCO_3 and $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$ could increase number of nodules. The number of nodules were increased from 5 at control to 9 and 15 at CaCO_3 and $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$ respectively. Fresh weight of nodules were also increased by application of CaCO_3 and $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$. At control the fresh weight was 85 mg, while at CaCO_3 and $[\text{CaCO}_3 + \text{TSP}]$ were 171 and 360 mg respectively. Based on antibiotic resistant mutant and REP-PCR, strain USDA 110SB occupied 87 and 98.7 percent of nodules formed by soybean plant variety of Tidar and 23D. The rest with only of 13.0 and 1.3 percent respectively for soybean variety Tidar and 23D, were occupied by strain 106. Increasing the rate of strain 106 up to 4 times the rate of USDA 110SB did not increased the occupancy of the strain 106. Delay of inoculation also could not change the competitiveness pattern of these two *Bradyrhizobium japonicum* strains. The results of this study shown the importance of the effective and competitive of nodule forming bacteria on the establishment of an effective symbiotical nitrogen fixation, particularly on agriculture areas with soybean cultivation background.

Key Words : Competition, *Bradyrhizobium japonicum*, Antibiotic Mutant resistant, REP-PCR, Soybean

PENDAHULUAN

Fiksasi N secara hayati yang efektif adalah sumber utama unsur N untuk tanaman, dan sekaligus untuk meningkatkan produksi pertanian yang berkesinambungan. Namun untuk mencapai sasaran tersebut salah satunya diperlukan adanya bakteri pembentuk bintil akar (BBA) yang efektif, mampu untuk bertahan hidup serta mampu untuk berkompetisi dengan BBA indigenus dalam lingkungannya.

Pemberian BBA untuk meningkatkan produksi kedele di Indonesia sudah dilakukan sejak tahun 1936 dengan mengimpor bakteri yang efektif dari luar negeri (Newton, 1962). Budidaya kedele terus menerus menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah dan populasi BBA dalam tanah, baik yang import maupun yang indigenus. Kondisi inilah yang sering menyebabkan kenapa respon tanaman kedele terhadap pemberian BBA tidak konsisten. Adanya jumlah BBA efektif yang tinggi karena budidaya kedele yang intensif akan menyebabkan introduksi BBA baru akan tidak berguna lagi. Selain itu adanya peningkatan jumlah BBA indigenus juga akan menghalangi manfaat positif dari pemberian BBA dari luar. Bakteri indigenus walaupun sering tidak efektif, namun lebih mampu bertahan hidup dan bersaing untuk membentuk bintil akar. Banyak peneliti melaporkan tentang kegagalan dalam pemberian bakteri untuk meningkatkan produksi tanaman kedele, dan kebanyakan disebabkan oleh ketidakmampuan bakteri luar untuk bersaing dengan bakteri indigenus dalam pembentukan bintil akar (Saono, 1987). Oleh karena itu, penelitian kompetisi ini dilakukan untuk memberikan pengetahuan dasar yang jelas tentang perlu tidaknya pemberian bakteri luar untuk meningkatkan produksi kedele.

Di Indonesia, walaupun arti pentingnya fiksasi N untuk tanaman kedele sudah lama diketahui, namun manfaat besarnya belum sepenuhnya di eksploitasi. Penelitian kebanyakan hanya dilakukan untuk isolasi bakteri-bakteri baru, produksi inokulan dan evaluasi aspek-aspek nilai agronominya saja. Selain itu, walaupun sudah ditunjukkan secara jelas dari peneliti-peneliti terdahulu bahwa banyak respon negatif dari hasil pemberian BBA, namun hampir tidak ada perhatian yang diberikan untuk melakukan penelitian pada ekologi BBA (Saono, 1987). Kekurangan pengetahuan ini menghambat eksploitasi secara besar-besaran fiksasi N secara hayati di Indonesia, dan hal ini membuat studi tentang kompetisi BBA lebih diperlukan lagi.

Oleh karena itu, dengan menggunakan metode antibiotic mutant resistant dan REP-PCR beberapa percobaan Rhizotron dilakukan untuk mempelajari kompetisi antara 2 macam BBA yang berbeda.

MATERIAL DAN METODE

Percobaan RHIZOTRON dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Wageningen University, Belanda. Rhizotron dibuat dari petridish plastik diameter 12 cm yang pada ujungnya dipotong 1,0 cm untuk melakukan tanaman tunbuh (Gambar 1). Contoh tanah yang digunakan adalah contoh tanah masam yang diambil dari Sitiung, Sumatra Barat. Contoh tanah dikeringanginkan, ditumbuk dan disaring dengan ukuran diameter 2 mm.

Dengan metode penimbangan contoh tanah dibuat basah dengan penambahan aquades sampai tercapai kadar lengas kapasitas lapang. Kemudian contoh tanah basah dengan berat 70 gram dimasukkan kedalam Rhizotron. Benih kedele varietas Tidar dan 23D dikecambahkan secara steril pada 1% agar sampai tumbuh akar 0,5 – 1,0 cm. Biji kedele disterilkan dengan cara pertama ditanam selama 5 menit dalam larutan alkohol 70%. Kemudian biji kedele ditanam dalam larutan H₂O₂ selama 10 menit. Biji kedele lalu dicuci 3 kali dengan aquades steril. Biji kedele yang sudah steril kemudian dikecambahkan diatas agar 1 % selama 24 – 48 jam pada suhu kamar.

Kecambah ditanam pada tanah dalam Rhizotron kemudian diinkubasikan semalam pada ruang tanam, dan percobaan rhizotron siap untuk mendapatkan perlakuan. Inokulan bakteri dibuat dengan membiakkan bakteri *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 110SB (antibiotik mutan) dan strain 106 pada media larutan yang mengandung Yeast Extract Mannitol (Vincent, 19970). Larutan media untuk bakteri strain USDA 110 mengandung Streptomycin 1000 ppm dan Bacitracin 250 ppm. Biakan digoyang dengan mechanical-shakter 100 rpm selama 7 hari dengan temperature 30 °C. Larutan biakan ini mengandung bakteri dengan jumlah sel 10⁹ sel (cfu)/ml, dan diaplikasikan dengan di drop dengan menggunakan jarum steril habis pakai sebanyak 5 tetes (0,5 ml)/tanaman. CaCO₃ dan CaCO₃ + TSP diaplikan dalam bentuk larutan dengan kadar masing-masin 0,075 gram dan 0,0125 gram/tanaman. Identifikasi bakteri pembentuk bintil akar dilakukan dengan metode Pricking. Setelah 20 hari setelah perlakuan tanaman dipanen, jumlah bintil akar dihitung dan ditiimbang. Semua bintil akar disterilisasi seperti sterilisasi biji kedela diatas, kemudian ditusuk (Pricking) secara aseptik dengan jarum inokulasi dan diinokulasikan pada media Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA, Vincent, 1970) petridish. Diperlukan 2 petridish yaitu dengan media YEMA+Congo Red dan YEMA+Congo Red+ Streptomycin+Bacitracin. Koloni bakteri yang dapat tumbuh pada kedua macam media tersebut dapat dikatagorikan sebagai bakteri strain USDA 100SB, sedangkan yang hanya tumbuh pada media YEMA+CV dikategorikan sebagai bakteri strain 106. Untuk memastikan kevalidan data dari metode Pricking tersebut, dengan teknik biologi molekuler, koloni yang tumbuh

diidentifikasi dengan metode Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-PCR (Judd et al, 1993), berdasarkan penggunaan primer yang komplemen terhadap urutan basa yang berulang-ulang (repetitive sequences) dalam sebuah genom (Gambar 2).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Pengaruh pelet biji terhadap pembentukan bintil akar tanaman kedele

Pelet Biji	Bintil akar/tanaman	
	Jumlah	Berat Basah (mg)
Kontrol	5,0 c	85,0 c
CaCO ₃	9,0 b	171,0 b
CaCO ₃ + TSP	15,0 a	360,0 a

Tabel 2. Prosentase bintil akar yang berasal dari bakteri *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 dan strain 106 dengan jumlah sel yang sama diidentifikasi dengan metode Antibiotik Mutan.

Pelet biji	Kedele var. Tidar		Kedele var. 23D	
	Strain USDA 110	Strain 106	Strain USDA 110	Strain 106
Kontrol	72	28	97	3
CaCO ₃	94	6	99	1
CaCO ₃ + TSP	95	5	100	0
Rata-rata	87	13	98,7	1,3

Tabel 3. Prosentase bintil akar yang berasal dari bakteri *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 dan strain 106 dengan jumlah sel yang berbeda diidentifikasi dengan metode Antibiotik Mutan.

Pelet Biji	Ratio jumlah sel (USDA110 : 106)	Kedele var. Tidar		Kedele var. 23D	
		USDA110	106	USDA110	106
Kontrol	1 : 1	93	7	100	0
	1 : 2	50	50	100	0
	1 : 4	74	26	91	9
CaCO ₃	1 : 1	100	0	100	0
	1 : 2	90	10	97	3
	1 : 4	92	8	100	0
CaCO ₃ + TSP	1 : 1	100	0	100	0
	1 : 2	93	7	100	0
	1 : 4	91	9	100	0

Tabel 4. Prosentase bintil akar yang berasal dari bakteri *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 dan strain 106 dengan jumlah sel yang sama pada tempat yang berbeda diidentifikasi dengan metode Antibiotik Mutan dan REP-PCR.

Pelet Biji	Lokasi inokulasi	Antibiotik Mutan		REP-PCR	
		USDA110	106	USDA110	106
CaCO ₃	Ujung akar	72	28	72	28
CaCO ₃ + TSP	Ujung akar	71	29	71	29
CaCO ₃ + TSP	0,5 cm dibawah ujung akar	83	17	83	17
CaCO ₃ + TSP	1,0 cm dibawah ujung akar	91	9	91	9

dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian CaCO₃ dan [CaCO₃ + TSP] dapat meningkatkan jumlah dan berat bintil akar tanaman kedele varietas Tidar dan 23D pada tanah masam Sitiung, Sumatra. Hal ini menunjukkan bahwa proses infeksi bakteri dalam pembentukan bintil akar terjadi pada saat-saat awal pertumbuhan akar tanaman kedele. Setelah terjadi infeksi, maka proses pembentukan dan fungsi bintil akar tidak dipengaruhi lagi oleh kemasaman tanah. Melihat data-data pada tabel 2, 3 dan 4, menunjukkan bahwa BBA *B. japonicum* USDA 110SB selalu mendominasi bintil-bintil akar yang terbentuk, baik pada kondisi masam pada kontrol maupun kondisi netral pada pemberian CaCO₃ dan [CaCO₃ + TSP]. Peningkatan jumlah BBA strain 106 sampai 4 kali lebih banyak daripada strain USDA 110 SB dan pengunduran waktu inokulasi tidak mampu merubah pola kompetisi yang terjadi. Hal ini menunjukkan bahwa BBA USDA 110SB adalah efektif dan mempunyai daya saing yang tinggi dalam pembentukan bintil akar. Pemakaian BBA ini akan sangat membantu dalam meningkatkan produksi kedele pada lahan-lahan bukaan baru. Namun demikian dalam pemakaian selanjutnya harus selalu memperhatikan kondisi riil BBA saat bakteri efektif yang baru akan digunakan. Karena sudah sering dilaporkan bahwa budidaya kedele yang kontinyu akan meningkatkan jumlah dan populasi BBA indigenus, yang pada level-level tertentu akan mengganggu introduksi BBA efektif yang baru. Pada tabel 4 menunjukkan bahwa hasil identifikasi bakteri dalam bintil akar dengan antibiotic mutant resistant sama dengan yang dihasilkan dengan teknik biologi molekular, REP-PCR. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa BBA *B. japonicum* USDA 110SB adalah efektif dan efisien dalam pembentukan bintil akar. Teknik Antibiotic Mutant Resistant adalah cara yang sederhana dan murah dalam mempelajari daya kompetisi antara BBA tanaman kedele.

UCAPAN TERIMA KASIH

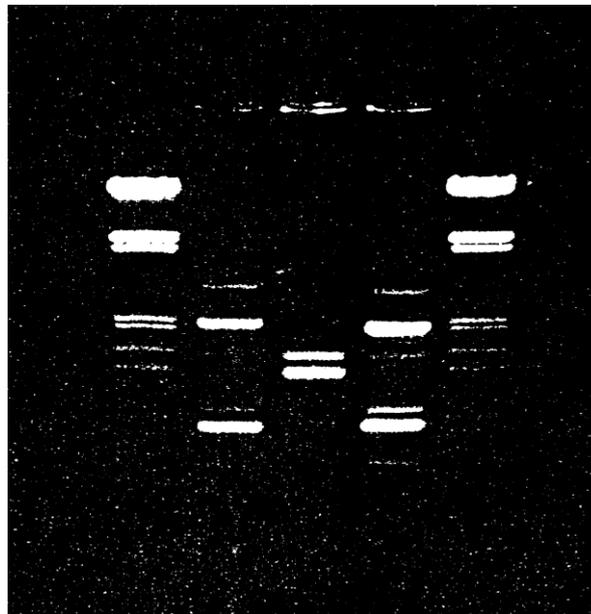
Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Willem de Vos dan Dr. Ir. Lie Tek An Department of Microbiology, Wageningen Agriculture University Belanda atas bimbingannya dan terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. AMARGER N 1981, Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 13, 475-480
2. AMARGER N and LOBREAU JP 1982, Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. *Applied and Environ. Microb.* 44, 583-588
3. BERG RK, LOYNACHAN TE, ZABLOTOWICZ RM AND LIEBERMAN MT 1988, Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in IOWA soils. *Agronomy J.* 80, 876-881
4. JUDD AK, M SCHNEIDER, MJ SADWOSKY AND FJ DE BRUIN 1993, Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1702-1708
5. STREETER JG 1994, Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can. J. Microbiol.* 40, 513-5522
6. WEAVER RW AND FREDERICK LR 1974a, Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L Merril. I. Greenhouse studies. *Agron. J* 66, 229-232
7. WEAVER RW AND FREDERICK LR 1974b Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L Merril. II. Field studies. *Agron. J* 66, 233-236
8. ZDOR RE AND PUEPPKE SG 1990, Competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138 in soil containing indigenous rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 22, 607-613
9. THIES JE, BOHLOOL BB, and SINGLETON PW 1992, Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Can J. Microbiol.* 38, 493-500



Gambar 1. Tanaman kedele pada Rhizotron



Gambar 2. Produksi REP-PCR dari *Bradyrhizobium japonicum*, strain USDA 110SB kolom nomor 2 dari kanan dan kiri, dan strain 106 kolom tengah

