

Koleksi, Karakterisasi, dan Preservasi Mikroba Penyubur Tanah dan Perombak Bahan Organik

Dwi N. Susilowati, Rosmimik, Rasti Saraswati, R.D.M. Simanungkalit, dan Lukman Gunarto

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penyimpanan isolat mikroba penyubur tanah umumnya masih di dalam medium agar miring, dan hanya sedikit isolat yang telah diliofilisasi untuk penyimpanan jangka panjang. Di samping itu, karakterisasi secara lengkap, baik morfologi, fisiologi, biokimia, ketahanan terhadap antibiotik, dan profil genetik (schizotipe) baru dilakukan pada isolat *Rhizobium* kedelai. Pada penelitian ini dilakukan kegiatan karakterisasi morfologi, fisiologi, biokimia terhadap 16 isolat *Rhizobium* hasil fusi protoplas intergenerik dan 19 isolat hasil fusi intraspecies, serta 106 isolat bakteri endofitik dan 5 isolat filosfer. Sebanyak 106 isolat bakteri endofitik telah diuji kemampuannya dalam menghasilkan zat pemacu tumbuh auksin dan menambat nitrogen, sedangkan isolat bakteri filosfer hanya diuji kemampuan-nya dalam menambat nitrogen. Selain itu, sebanyak 23 isolat mikroba perom-bak bahan organik telah diisolasi dari sumber kayu lapuk dan jerami. Di antara 23 isolat tersebut, isolat kapang M10 memiliki aktivitas enzim tertinggi (0,1298 U/ml). Aktivitas selulase untuk enzim CMC-ase diperoleh 0,129 U/ml, β -glukosi-dase diperoleh 0,0974 U/ml, dan Fp-ase 0,148 U/ml. Kadar protein untuk masing-masing enzim 0,253 mg/ml untuk CMC-ase; 0,198 untuk β -glukosidase; dan 0,276 untuk Fp-ase. Enzim yang didapatkan kasar, sehingga dilakukan pengendapan dengan amonium sulfat dan konsentrasi yang memberikan aktivitas terbaik ialah 60% untuk CMC-ase dan β -glukosidase, dan 70% untuk Fp-ase.

Kata kunci: Koleksi dan karakterisasi, mikroba, penyubur tanah, perombak bahan organik

ABSTRACT

Most of soil fertilizing microbes was preserved at slant agar, and only several microbes have conserved by freeze dried for long-term preservation. Complete characterization included morphology, physiology, biochemical, and genetic analysis have been carried out to soybean *Rhizobium*. The aim of this research is to characterize to both intergeneric (16 isolates) and intraspecific (19 isolates) *Rhizobium* and endophytes and phyllosfer microbes. Moreover, we also evaluated some endophyte isolates to produce plant growth promoting hormone (auksin) and to fix nitrogen, but especially for phyllosphere were evaluated the ability to fix nitrogen. We have collected 23 isolates (bacteria and fungus) which is potensial for organic decomposer and 1 yeast with highest cellulolytic activity (0.1298 U/ml). Cellulolytic activity to CMC-ase, β -glukosidase, and Fp-ase is respectively about 0.129 U/ml, 0.0974 U/ml, and 0.148 U/ml and the protein content is respectively 0.253 mg/ml, 0.198, and 0.276. Enzyme obtained is still crude, so it is important to precipitate with ammonium sulphate. Concentration of the ammonium sulphate that gave the best activity for CMC-ase, β -glukosidase, and Fp-ase is respectively 60% , 60%, and 70%.

Key words: Collection and characterization, microbe, soil fertilizing, organic decomposer

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan biodiversitas, terutama keanekaragaman hewan, tanaman, dan mikroba. Keanekaragaman mikroba ternyata jauh lebih luas daripada keanekaragaman hewan dan tanaman. Hanya karena kurang adanya paparan yang cukup mengenai dunia mikroba, kebanyakan para pakar ilmu pengetahuan alam kurang memberi perhatian atau bahkan tidak menyadari peranan yang luar biasa dari jasad yang tak kasat mata tersebut terhadap berbagai bidang kehidupan manusia.

Mikroba simbiotik baik berupa bakteri ataupun fungi merupakan contoh mikroba yang prospektif di bidang pertanian dan kehutanan. Sejumlah mikroba simbiotik seperti *Rhizobium*, mikoriza, ganggang hijau biru, bakteri endofitik diazotrof, dan frankia, dikenal luas peranannya sebagai biofertilizer yang dapat meningkatkan efisiensi penggunaan pupuk sintetis, sehingga sangat menunjang sistem pertanian yang berwawasan lingkungan.

Berbagai bakteri penambat nitrogen telah banyak diisolasi dari rhizosfer dan rhizoplane tanaman non-Leguminosae (Dobereiner, 1992 dalam Kirchhof *et al.*, 1997). Namun, efisiensi penambatan N_2 yang dimiliki rendah dibandingkan dengan bakteri diazotrof endofit. Hal ini berkaitan dengan ketersediaan fotosintat bagi bakteri rhizosfer maupun rhizoplane yang terbatas. Sebaliknya pada bakteri diazotrof endofitik, tanaman secara langsung menyediakan fotosintat sebagai nutrisi bagi pertumbuhan bakteri, dan juga menyediakan lingkungan dengan kadar oksigen rendah, sehingga memacu ekspresi enzim nitrogenase. Selain itu, bakteri endofit juga tidak harus berkompetisi dengan mikroba tanah yang lain untuk mendapatkan eksudat akar untuk kelangsungan hidupnya (Kirchhof *et al.*, 1997; James *et al.*, 2001).

Di samping itu, beberapa jenis bakteri dan juga fungi yang dikenal sebagai mikroba perombak bahan organik dapat mempercepat proses perombakan limbah padat pertanian (jerami padi, brankas dan kulit jagung, ongkok dan tandan kosong kelapa sawit) menjadi unsur yang lebih sederhana, sehingga mudah diserap oleh tanaman. Apabila mikroba perombak bahan organik ini dikembangkan, maka hasil dekomposisi yang berupa kompos dapat dikembalikan ke lapang sebagai pupuk organik yang dapat mempertahankan status bahan organik tanah agar tetap tinggi.

Mengingat besarnya peran beberapa jenis mikroba di atas, maka keberadaan mikroba tersebut perlu dikonservasi dalam bentuk koleksi kultur. Koleksi kultur mikroba memberikan jaminan bahwa mikroba yang telah dideskripsikan tersimpan dengan aman dan baik, sehingga tersedia setiap saat untuk keperluan generasi sekarang dan masa mendatang.

Tujuan penelitian ini ialah untuk (1) konservasi sejumlah mikroba penyubur tanah dan perombak bahan organik, termasuk bakteri penambat nitrogen udara, pemacu tumbuh; (2) mengetahui karakter morfologi, fisiologi, dan biokimia dari sejumlah isolat unggul mikroba penyubur tanah dan

perombak bahan organik; dan (3) mengembangkan sumber plasma nutfah mikroba penyubur tanah dan perombak bahan organik.

BAHAN DAN METODE

Koleksi, Karakterisasi, dan Preservasi Mikroba Penyubur Tanah dan Tanaman

Karakterisasi yang dilakukan meliputi karakterisasi morfologi, fisiologi, dan biokimia dari isolat mikroba penyubur tanah dan tanaman yang sudah ada di Laboratorium Mikrobiologi, Kelti Mikrobiologi dan Teknologi Proses (MTP), Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya genetik Pertanian (Balitbiogen), Bogor. Isolat yang dikarakterisasi dan dipreservasi termasuk isolat *Rhizobium* kedelai, *Rhizobium* kacang tanah, *Rhizobium* kacang hijau, *Rhizobium* sengon, bakteri pelarut P, bakteri penghasil zat pemacu tumbuh (indole acetic acid, IAA; *Azospirillum*), *Azotobacter*, bakteri endofitik, dan cendawan *vesicular arbuscular mycorrhiza* (VAM). Preservasi atau penyimpanan dilakukan untuk jangka pendek dan jangka panjang. Penyimpanan jangka pendek dilakukan dalam tabung agar miring, sedangkan penyimpanan jangka panjang, dengan cara liofilisasi di dalam ampul.

Kegiatan juga dilakukan untuk koleksi, karakterisasi, dan preservasi bakteri endofitik dari jaringan tanaman padi dan jagung. Mikroba penyubur tanah asal jaringan batang atau akar tanaman padi dan jagung diisolasi dengan cara sebagai berikut: mula-mula lapisan luar batang atau akar tanaman padi atau jagung di-buang, kemudian batang dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan air bebas ion. Selanjutnya ukuran batang atau akar diperkecil untuk memudahkan isolasi bakteri ini dengan cara dipotong-potong sebesar 2-3 cm dan dikeringkan dengan kertas tissue. Setelah itu, dilakukan sterilisasi permukaan batang atau akar dengan cara sebagai berikut: sebanyak 10 g bagian tanaman dengan *shaker* selama 30 menit dalam 500 ml Erlenmeyer yang berisi 250 ml air bebas ion steril. Jaringan tanaman tersebut selanjutnya dipindahkan ke dalam gelas piala steril, dicuci dua kali dengan akuades steril, dan disterilisasi permukaannya dengan 0,2% HgCl₂ selama 30 detik untuk akar dan selama 60 detik untuk batang. Kemudian jaringan tanaman dicuci enam kali dengan akuades steril, dipotong kecil-kecil dan dihancurkan dengan blender hingga homogen. Setelah itu, dibuat pengenceran serial dan disebar pada medium tumbuhnya atau dalam tabung yang mengandung medium JNFb (Baldani *et al.*, 1992). Medium ini merupakan medium malat semi padat, dengan pH 5,8. Isolat mikroba endofitik yang diperoleh dikarakterisasi ciri-ciri morfologi, fisiologi, dan biokimianya. Selanjutnya, isolat unggul yang diperoleh disimpan secara liofilisasi di dalam ampul.

Koleksi, Karakterisasi, dan Preservasi Mikroba Perombak Bahan Organik

Sampel berupa kayu lapuk, sampah, dan tanah diambil dari daerah Bogor. Masing-masing sampel sebanyak 10 g disuspensikan ke dalam 90 ml medium mineral (KH_2PO_4 1 g/l, NaCl 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,4 g/l, CaCl_2 0,1 g/l), yang ditambah dengan 10% substrat berupa serbuk gergaji yang telah diperlakukan dengan NaOH (pH 7,5). Suspensi tersebut digoyang dengan *shaker* yang berkecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 3 hari. Selanjutnya, 10 ml suspensi diambil dan dimasukkan ke dalam 90 ml medium mineral yang telah ditambah substrat serbuk gergaji dan digoyang dengan *shaker* lagi. Setelah itu, 10 ml suspensi yang baru dimasukkan ke dalam 90 ml medium mineral, ditambah substrat serbuk gergaji dan kembali digoyang. Kemudian 0,1 ml suspensi hasil biakan disebar pada cawan petri berisi medium Luria Agar dan Carboxy Methyl Cellulose. Selanjutnya, dilakukan pengujian isolat unggul perombak bahan organik yang diperoleh berdasarkan (a) aktivitas selulase dan kadar enzim, (b) karakter enzim yang diproduksi, dan (c) pH optimum untuk pertumbuhannya.

Analisis Aktivitas Selulase dan Kadar Protein

Enzim selulase diperoleh dengan cara pembuatan *starter* dengan mengambil satu tabung isolat jamur selulolitik M10, lalu ditambahkan 2 ml NaCl 0,85%, dikerok, dan dimasukkan ke dalam 150 ml media produksi Mandels (14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20% KH_2PO_4 , 3% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3% urea, 30% CaCl_2 , 0,5% FeSO_4 , 1,6% MnSO_4 , 1,4% ZnSO_4 , dan 2% CoCl_2) dengan substrat serbuk gergaji. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 5 x 24 jam dengan digoyang pada *shaker* berkecepatan 150 rpm. Enzim selulase kasar skala labu Erlenmeyer dipanen dari biakan dengan cara men-sentrifus dengan kecepatan 10.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit, dan supernatannya diambil.

Aktivitas selulase diukur berdasarkan metode Mandel yang dimodifikasi sebagai berikut: 1 ml filtrat enzim, 1 ml bufer sitrat pH 4,8, 1% substrat (CMC untuk aktivitas endoglukanase, Avisel untuk aktivitas aviselase, selobiohidrolase untuk aktivitas β -glukosidase, dan kertas saring Whatman No. 1 untuk aktivitas filter paperase). Prainkubasi campuran filtrat enzim, bufer sitrat, dan substrat dilakukan dalam tabung berisi air di atas penangas api selama 5 menit, lalu masing-masing campuran divorteks. Inkubasi pada pengujian aktivitas endoglukanase (CMC-ase) dan β -glukosidase dilakukan selama 30 menit pada suhu 45°C, sedangkan pada pengujian aktivitas Fp-ase dan aviselase selama 1 jam pada suhu 60°C. Setelah itu, dilakukan penambahan 3 ml larutan DNS (Dinitro Salicylic Acid), divorteks, dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 15 menit. Kontrol disiapkan dengan menambahkan 1 ml filtrat enzim setelah penambahan 3 ml DNS, sedangkan blangko berisi campuran 2 ml akuades, 1 ml bufer, dan 3 ml DNS. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 540 nm. Satu unit aktivitas enzim ialah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 mikromol glukosa dalam 1 menit pada kondisi pengukuran enzim.

Larutan standar glukosa pada selang konsentrasi 0,02-0,5 mg/ml dalam bufer digunakan untuk membuat kurva standar gula. Sebanyak 1 ml larutan gula standar, 1 ml bufer, dan 1 ml substrat direaksikan dengan 3 ml DNS, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan hingga siap diukur absorbansi dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 540 nm.

Kadar protein ditentukan berdasarkan metode Bradford (1976) dengan pengikatan zat warna CBB. Pada 0,2 ml filtrat ditambahkan 5 ml pereaksi Bradford, lalu dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam. Absorbansi filtrat diukur pada panjang gelombang 55 nm. Standar protein yang digunakan adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 300-700 mikrogram BSA/ml akuades.

Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim dilakukan melalui (1) pengendapan menggunakan amonium sulfat, (2) penentuan pH suhu optimum, penentuan pH, dan stabilitas.

Pengendapan protein dengan amonium sulfat. Proses ini dilakukan berdasarkan metode Scope (1982). Pada 20 ml filtrat enzim ditambahkan larutan je-nuh amonium sulfat setetes demi setetes sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Suhu campuran dipertahankan 4°C dengan menambahkan es batu pada bagian luar wadah. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifus pada kecepatan 10.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Endapan enzim dilarutkan dengan 20 ml bufer sitrat 0,05 M, pH 4,8. Selanjutnya diperoleh kadar protein dan aktivitas selulase diukur kembali. Penentuan pH optimum filtrat yang memberikan aktivitas maksimal dilakukan dengan menguji aktivitas selulase pada pH 4,5; 4,8; 5,5; dan 5,7, sedangkan penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas selulase pada suhu 37, 45, 50, 55, dan 60°C.

Penentuan pH dan suhu stabilitas. Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim dianalisis dengan menginkubasi enzim di dalam bufer dengan pH 4,5; 4,8; 5,0; dan 5,5 pada suhu 45°C. Pengambilan contoh enzim dilakukan selama rentang waktu inkubasi 5 jam dengan interval waktu satu jam. Setelah masa inkubasi berakhir, aktivitas enzim dan kadar protein diukur pada kondisi pH dan suhu optimum. Termostabilitas enzim diuji dengan melakukan inkubasi enzim pada suhu (37, 45, dan 50°C). Pengambilan contoh dilakukan juga dilakukan selama rentang waktu inkubasi 5 jam dengan interval waktu satu jam. Setelah masa inkubasi berakhir, aktivitas enzim dan kadar protein diukur pada kondisi pH dan suhu optimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi, Karakterisasi, dan Preservasi Isolat Mikroba Penyubur Tanah dan Tanaman

Tabel 1. Daftar isolat penyubur tanah koleksi Balitbiogen tahun 2002 dan manfaatnya

No.	Nama spesies	Jumlah isolat	Manfaat
1.	<i>Sinorhizobium fredii</i>	24	Bahan aktif biofertilizer
2.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	24	Bahan aktif biofertilizer
3.	<i>Rhizobium</i> sp.	28	Bahan aktif biofertilizer
4.	<i>Rhizobium</i> hasil mutasi EMS	2	
5.	<i>Rhizobium</i> hasil fusi intergenerik	16	
6.	<i>Rhizobium</i> hasil fusi intraspecies	19	Inokulan benih <i>matricconditioning</i> (tahap penelitian)
7.	Standar <i>Rhizobium</i>	7	Isolat Referensi
8.	<i>Azospirillum</i> sp.	24	Bahan aktif biofertilizer
9.	<i>Azotobacter</i>	7	Bahan aktif biofertilizer
10.	<i>Micrococcus</i>	1	Bahan aktif biofertilizer
11.	<i>Bacillus</i> sp.	1	Bahan aktif biofertilizer
12.	<i>Aspergillus niger</i>	1	Bahan aktif biofertilizer
13.	<i>Enterophospora</i>	1	Bahan aktif biofertilizer
14.	<i>Enterophospora colombiana</i>	2	Bahan aktif biofertilizer
15.	<i>Glomus manihotis</i>	2	Bahan aktif biofertilizer
16.	<i>Glomus</i> sp.	2	Bahan aktif biofertilizer
17.	<i>Gigaspora</i> sp.	2	Bahan aktif biofertilizer
18.	Filosfer	5	Bahan aktif biokontrol
19.	Endofit	106	Bahan aktif biofertilizer
Total isolat		274	

Isolat *Rhizobium* hasil fusi intraspecies untuk inokulan benih masih dalam penelitian

Koleksi isolat mikroba penyubur tanah yang dimiliki Balitbiogen pada umumnya masih disimpan dalam bentuk penyimpanan jangka pendek di dalam tabung medium agar miring. Sebagian isolat telah disimpan secara liofilisasi di dalam ampul. Isolat cendawan VAM dilakukan di dalam medium tanah steril. Koleksi isolat mikroba penyubur tanah yang dimiliki Balitbiogen hingga tahun 2002 berjumlah 274 isolat (Tabel 1). Dari jumlah tersebut, baru isolat *Rhizobium* kedelai yang telah dikarakterisasi secara lengkap. Karakter morfologi koloni *Rhizobium* hasil fusi protoplas, baik secara intergenerik maupun intraspecies, tidak mengalami perubahan dari karakter morfologi tetuanya, yaitu berbentuk bulat, cembung, tepian rata, berwarna merah jambu (*pink*), dan berlendir.

Berdasarkan uji keefektifan menambat N_2 udara dari isolat hasil fusi proto-plas intergenerik, empat isolat sangat efektif menambat N_2 , yaitu INTER-7, INTER-9, INTER-10, dan INTER-13 (Tabel 2). Dari hasil fusi protoplas intraspecies didapatkan 5 isolat yang sangat efektif menambat N_2 , yaitu INTRA-4, INTRA-8, INTRA-10, INTRA-15, dan INTRA-23. Isolat INTRA-8 memiliki nilai keefektifan simbiose dan kapasitas simbiose tertinggi dari kelima isolat lainnya. Isolat ini telah digunakan dalam penelitian selanjutnya sebagai sumber inokulan untuk benih *matri-conditioning*.

Di samping karakterisasi berdasarkan aktivitas enzim, isolat bakteri diazotrof endofitik dan filosfer juga dikarakterisasi kemampuannya memproduksi senyawa pemacu tumbuh IAA dan ARA. Sebanyak 106 isolat mikroba endofit telah diuji kemampuannya menghasilkan auksin (IAA dan

ARA) secara kolorimetri, menggunakan spektrofotometer, dan kemampuan menambat nitrogen udara, menggunakan kromatografi gas. Pada Tabel 3 disajikan 60 isolat mikroba endofit yang memiliki potensi menghasilkan senyawa pemacu tumbuh, IAA atau ARA yang cukup tinggi, sedangkan 46 isolat lainnya memiliki potensi yang rendah atau tidak menghasilkan sama sekali.

Berdasarkan hasil seleksi lanjut, telah dipilih lima isolat unggul bakteri endofitik pada tanaman padi, yaitu isolat BCr 1.2, BCr 2.1, BCr 2.3, BCbd 1.3, dan APK 2.4, sebagai sumber inokulan tanaman padi. Dua isolat unggul bakteri endofitik pada tanaman jagung, yaitu JCbd 2.1 dan JLk-CN 2.5, juga dipilih sebagai sumber inokulan tanaman jagung. Pada saat ini, Balitbiogen hanya memiliki lima isolat mikroba filosfer asal tanaman padi, jagung, dan kedelai yang disimpan di kultur koleksi.

Koleksi, Karakterisasi, dan Preservasi Isolat Mikroba Perombak Bahan Organik

Tabel 2. Karakteristik biokimia dan keefektifan 35 isolat *Rhizobium* hasil fusi protoplas intergenerik dan intraspecies

Kode isolat	Karakteristik biokimia					Karakteristik keefektifan simbiotik
	<i>Congo red</i> (25 µg/ml)	BTB (25 µg/ml)	NaCl 2%	pH 4,5	pH 9	
INTER-1	tidak menyerap	Basa	-	++	++	Tidak efektif
INTER-2	tidak menyerap	Basa	-	+++	++	Kurang efektif
INTER-3	tidak menyerap	Basa	+	+++	+++	***
INTER-4	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	***
INTER-5	tidak menyerap	Basa	+	+++	+++	Kurang efektif
INTER-6	tidak menyerap	Basa	+	++	++	Tidak efektif
INTER-7	tidak menyerap	Basa	-	+++	++	Sangat efektif
INTER-8	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	***
INTER-9	tidak menyerap	Basa	-	+++	++	Sangat efektif
INTER-10	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	Sangat efektif
INTER-11	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	Efektif
INTER-12	tidak menyerap	Basa	-	++	++	Efektif
INTER-13	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	Sangat efektif
INTER-14	tidak menyerap	Basa	-	+++	++	***
INTER-15	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	Efektif
INTER-16	tidak menyerap	Basa	++	++	++	Kurang efektif
INTRA-2	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Efektif
INTRA-3	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	***
INTRA-4	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	Sangat efektif
INTRA-6	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Efektif
INTRA-7	tidak menyerap	Basa	-	+++	+++	Efektif
INTRA-8	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Sangat efektif
INTRA-10	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Sangat efektif
INTRA-12	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Efektif
INTRA-13	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Efektif
INTRA-14	tidak menyerap	Basa	-	++	+++	Efektif
INTRA-15	tidak menyerap	Basa	-	+++	+	Sangat efektif
INTRA-16	tidak menyerap	Basa	-	++	+	***
INTRA-18	tidak menyerap	Basa	-	++	-	Efektif
INTRA-21	tidak menyerap	Basa	-	++	-	Kurang efektif
INTRA-22	tidak menyerap	Basa	-	++	-	Efektif
INTRA-23	tidak menyerap	Basa	-	+++	-	Sangat efektif
INTRA-24	tidak menyerap	Basa	-	++	-	Efektif
INTRA-25	tidak menyerap	Basa	-	++	-	***
INTRA-26	tidak menyerap	Basa	-	++	-	***

- = tidak ada pertumbuhan, + = pertumbuhan kurang subur, ++ = pertumbuhan agak subur, +++ = pertumbuhan subur, *** = belum dilakukan pengujian

Pada tahun 2002, koleksi dan isolasi mikroba perombak bahan organik memperoleh 23 isolat yang terdiri atas 13 isolat bakteri dan 10 isolat kapang. Isolat-isolat tersebut 19 isolat di antaranya diisolasi dari kayu lapuk, sedangkan empat isolat diisolasi dari jerami. Pertumbuhan dan kemampuan bakteri merombak bahan organik ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium CMC, media spesifik yang digunakan untuk mengukur kemampuan selulolitik mikroba. Zona bening yang timbul menunjukkan terjadinya hidrolisis bahan organik dalam sub-strat yang diakibatkan oleh enzim selulase dari mikroba. Kemampuan selulolitik juga diukur secara kuantitatif dari aktivitas enzim selulase U/ml). Pada Tabel 4 di-sajikan 14 dari

Tabel 3. Daftar 60 isolat bakteri diazotrof endofitik dan filosfer dari koleksi Balitbiogen tahun 2002 yang memiliki potensi tinggi menghasilkan IAA atau ARA

Kode isolat	Produksi IAA (ppm)	ARA (umol/jam/tabung atau umol/g/30 menit)
ABd 3.2	1,182	---
BBd 1	8,295	---
BBd 1.2	4,699	---
BBd 3.2	3,636	0,0150
BBd 3.3	1,420	---
BCr 1.1	1,197	---
BCr 1.2	4,530	---
BCr 1.3.2	1,545	0,0209
BCr 2.1	1,727	1,2770
BCr 2.3	1,539	1,9495
BCr 3.1	1,727	0,0162
BCr 3.2	4,091	0,0014
BCr 3.4	1,727	---
BCbd 1.3	5,363	0,0116
BCbd 2.3	1,435	0,0690
BS III 3.1	1,079	---
BS III 3.2	1,420	0,0124
PCms 3.5	0,711	0,3564
BGb 2.1	1,363	0,0173
BGb 2.2	1,818	---
PKmS 1.2	1,171	---
PKmS 3B.3	1,046	0,0110
BLw 3.1	1,636	---
BLw 3.2	1,624	0,0134
PM 1.13	2,050	---
PM 1.14	4,100	---
PM 2.31	1,129	---
PM 2.32	1,297	0,0164
PM 2.33	1,506	0,0151
PM 3.2	1,129	0,0161
BNg 1.1	7,102	---
BPr 1.2.1	0,711	0,1210
BPr 1.2.2	2,454	0,0620
BPr 2.2	2,000	0,0310
BPr 2.3	5,795	---
APK 2.1	2,636	0,3690
APK 2.2	2,454	4,4400
APK 2.4	2,818	2,6830
APK 3.1	2,727	0,0168
APK 3.2	3,522	---
BRb 2.3	1,420	0,0194
C2.3	1,255	---
JCmg 1.2	1,129	---
JCmg 3.3	1,290	0,0390
JCb d 2.1	5,897	0,0590
JCb d 2.2	0,121	0,2570
JLk-CN 2.3	0,677	0,4690
JLk-CN 2.4	3,145	0,0390

23 isolat hasil koleksi mikroba perombak bahan organik yang memiliki aktivitas enzim relatif tinggi, berkisar antara 0,640 U/ml pada isolat bakteri 5.6.1.1 hingga 0,1298 U/ml pada isolat kapang M10.

Tabel 3. Lanjutan

Kode isolat	Produksi IAA (ppm)	ARA (umol/jam/tabung atau umol/g/30 menit)
JSHC 2.4	0,322	0,2190
JSHC 3.3	1,089	0,0550
JCpg 2.2	3,629	0,1020
JCpg 2.3	6,210	0,0360
JDNC 2	2,298	0,0440
JKW 1.1B	1,036	0,0620
JKW 2.2A	2,318	0,0860
JSMb1(1)	Tidak dianalisis	0,5454 umol/g/30 menit
KMb2	Tidak dianalisis	0,5660 umol/g/30 menit
Pa2(1)	Tidak dianalisis	0,6527 umol/g/30 menit
Ma7(1)	Tidak dianalisis	0,5333 umol/g/30 menit
Ta3(1)	Tidak dianalisis	0,5192 umol/g/30 menit

Tabel 4. Daftar 14 isolat dari 23 isolat bakteri perombak bahan organik koleksi Balitbiogen tahun 2002 dan aktivitas enzimatisnya

No.	Kode isolat	Asal isolat	Aktivitas enzim (U/ml)
1.	5.6.1.1	Kayu lapuk	0,0640
2.	6.6.1.1	Kayu lapuk	0,0785
3.	6.6.1.2	Kayu lapuk	0,0685
4.	6.6.1.3	Kayu lapuk	0,0742
5.	7.6.2.1	Kayu lapuk	0,0958
6.	7.6.2.2	Kayu lapuk	0,1043
7.	7.6.2.3.	Kayu lapuk	0,1087
8.	7.6.2.4	Kayu lapuk	0,1024
9.	9.6.1.1	Kayu lapuk	0,0935
10.	9.6.1.2	Kayu lapuk	0,1047
11.	M7	Kayu lapuk	0,0915
12.	M8	Kayu lapuk	0,0645
13.	M9	Kayu lapuk	0,0987
14.	M10	Kayu lapuk	0,1298

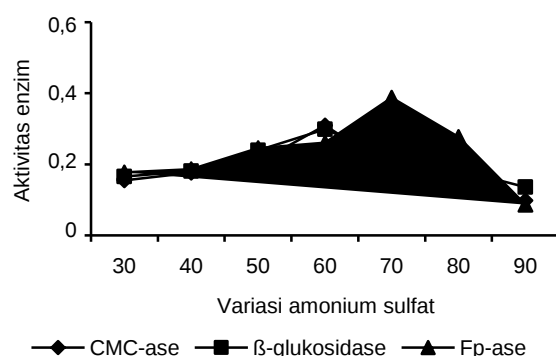
Isolat N. 1-10 = isolat bakteri, isolat No. 11-14 = isolat kapang

Kemampuan mikroba memproduksi enzim selulosa menjadikannya mampu menghidrolisis selulosa yang terdapat pada substratnya menjadi glukosa atau gula-gula lain yang larut dan dapat dijadikan sumber karbon bagi pertumbuhannya. Beberapa jenis kapang mampu menghidrolisis kompleks enzim selulase (Gong dan Tsao, 1979).

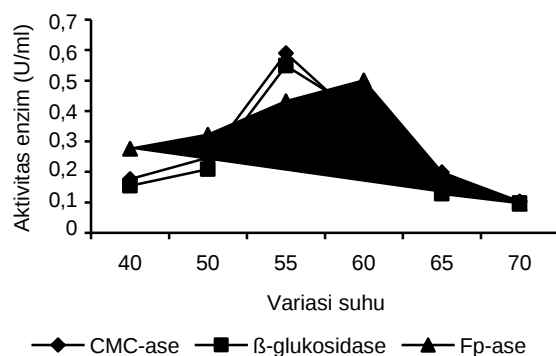
Filtrat enzim selulase yang diperoleh dari proses ekstraksi berupa enzim kasar (*crude*), sehingga masih perlu dimurnikan lebih lanjut dengan cara pengendapan menggunakan garam netral jenuh yang bersifat mudah larut, tidak toksik, dan dapat menstabilkan enzim seperti amonium sulfat. Pengendapan enzim ini dilakukan dengan larutan amonium sulfat dalam akuades dengan konsentrasi 30-90%. Pengendapan protein dengan amonium sulfat bertujuan untuk memurnikan protein dari kontaminan senyawa lain seperti karbohidrat dan lemak. Aktivitas enzim CMC-ase mempunyai nilai tertinggi ketika pengendapan enzim dilakukan dengan suspensi amonium

sulfat 60% (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan amonium sulfat pada konsentrasi 60% sudah jenuh dan tidak dapat larut lagi. Pada kondisi ini diharapkan enzim selulase yang terdapat di dalam filtrat telah mengendap seluruhnya.

Gambar 2 menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas enzim cenderung sejalan dengan peningkatan suhu reaksi. Aktivitas CMC-ase dan β -glukosidase mencapai puncaknya pada suhu 55°C, sedangkan aktivitas Fp-ase mencapai puncaknya pada suhu 60°C. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim secara umum ditunjukkan melalui mekanisme kompleks yang melibatkan fenomena berlawanan dari stimulasi dan inaktivasi. Aktivitas mula-mula akan meningkat dengan makin tingginya suhu, namun pada suatu titik tertentu akan terjadi inaktivasi enzim yang akan ditandai dengan menurunnya aktivitas enzim. Pengaruh suhu sesungguhnya agak kompleks, yaitu suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat pemecahan atau kerusakan enzim, sebaliknya semakin tinggi suhu semakin aktif enzim tersebut. Oleh



Gambar 1. Grafik yang menunjukkan pengaruh konsentrasi amonium sulfat terhadap aktivitas enzim (CMC-ase, β -glukosidase, Fp-ase) dari isolat M10

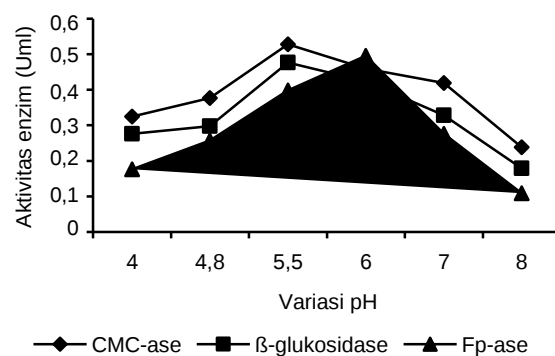


Gambar 2. Grafik yang menunjukkan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim (CMC-ase, β -glukosidase, Fp-ase) dari isolat M10

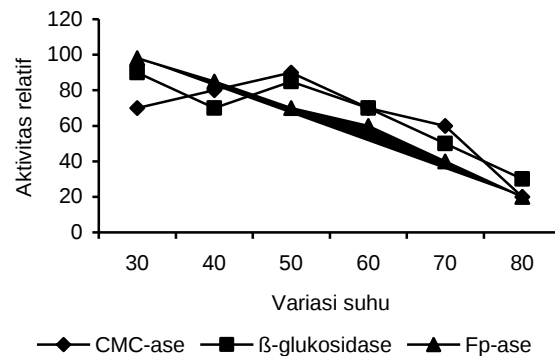
karena itu, ada dugaan bahwa CMC-ase dan β -glukosidase inaktivasi setelah suhu 50°C dan di atas 60°C untuk Fp-ase. Menurut Mandel *et al.* (1976) suhu optimum bagi kerja enzim selulase umumnya berkisar antara 50-60°C dan menurut Sen *et al.* (1982) enzim CMC-ase mempunyai suhu optimum pada 40-55°C.

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase menunjukkan bahwa nilai pH yang menghasilkan aktivitas optimum terjadi pada pH 5,5 untuk CMC-ase dan β -glukosidase, sedangkan untuk Fp-ase pada pH 6 (Gambar 3). Aktivitas selulase yang tinggi pada isolat kapang M10 sesuai dengan pernyataan Kulp (1975), bahwa pH optimum untuk aktivitas selulase kapang berkisar antara 4,5-6,5. Pada umumnya enzim hanya aktif pada kisaran pH yang terbatas. Nilai pH optimum suatu enzim ditandai dengan menurunnya aktivitas pada kedua sisi lainnya dari kurva yang disebabkan oleh turunnya afinitas atau stabilitas enzim. Pengaruh pH pada aktivitas enzim disebabkan oleh terjadinya perubahan tingkat ionisasi pada enzim atau substrat sebagai akibat perubahan pH (Irawadi, 1991).

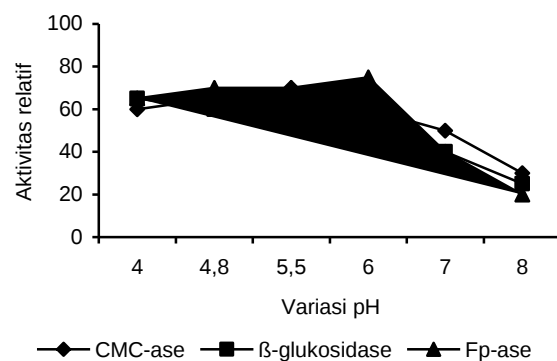
Enzim dari kapang M10 stabil jika dipanaskan pada suhu 55°C selama



Gambar 3. Grafik yang menunjukkan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (CMC-ase, β -glukosidase, Fp-ase) dari isolat M10



Gambar 4. Grafik yang menunjukkan stabilitas suhu dari isolat M10



Gambar 5. Grafik yang menunjukkan stabilitas pH dari isolat M10

30 me-nit untuk enzim CMC-ase dan β -glukosidase, sedangkan untuk Fp-ase stabil pada suhu 60°C selama 10 menit (Gambar 4). Kulp (1975) menyatakan bahwa enzim selulase cenderung tahan pemanasan. Misalnya, enzim selulase dari *Myrothecium verrucaria* masih menunjukkan aktivitas 20% setelah dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit.

Hasil evaluasi stabilitas enzim terhadap pengaruh pH menunjukkan bahwa reaksi enzim CMC-ase dan β -glukosidase stabil pada pH 5.5 dengan masa inkubasi 60 menit, sedangkan Fp-ase stabil pada pH 6.0 selama 90 menit (Gambar 5).

KESIMPULAN

1. Pada tahun 2002 telah diperoleh koleksi mikroba penyubur tanah sebanyak 274 isolat yang terdiri atas *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* sp., *Aspergillus niger*, cendawan VAM, bakteri filosfer, dan bakteri endofit.
2. Karakterisasi isolat *Rhizobium* hasil fusi intraspesies dan intergenerik menunjukkan bahwa morfologi koloni bakterinya tidak berubah dari morfologi koloni tetuanya, yaitu berbentuk bulat, cembung, tepi rata, berwarna *pink*, dan ber-lendir.
3. Empat isolat *Rhizobium* hasil fusi protoplas intergenerik (INTER-7, INTER-9, INTER-10, dan INTER-13) serta 5 isolat hasil fusi protoplas intraspesies (INTRA-4, INTRA-8, INTRA-10, INTRA-15, dan INTRA-23) sangat efektif menambat N_2 . Keefektifan dan kapasitas simbiotik tertinggi dimiliki oleh isolat INTRA-8.
4. Lima isolat bakteri endofitik dari padi (BCr 1.2, BCr 2.1, BCr 2.3, BCbd 1.3, dan APK 2.4) dan dua isolat dari jagung (JCbd 2.1 dan JLk-CN 2.5) tergolong unggul dalam menambat nitrogen dan menghasilkan zat pemacu tumbuh.

5. Sebanyak 23 isolat mikroba perombak bahan organik dari kayu lapuk dan jerami berhasil diisolasi dan dikarakterisasi. Isolat kapang M10 memiliki aktivitas enzim tertinggi, 0,1298 U/ml. Isolat ini memiliki aktivitas produksi selulase berupa enzim CMC-ase sebesar 0,129 U/ml, β -glukosidase 0,0974 U/ml, dan Fp-ase 0,148 U/ml. Kadar protein dari masing-masing enzim adalah 0,253 mg/ml pada CMC-ase, 0,198 mg/ml pada β -glukosidase, dan 0,276 mg/ml pada Fp-ase.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, F.L. Olivares, and J. Dobereiner. 1992.** Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 13:65-73.
- Bradford, M.M. 1976.** A Rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle biochemical of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Gong, C.S. and G.T. Tsao. 1979.** Cellulase and biosynthesis regulation. In D. Pearlman (*Ed.*). *Annual Report on Fermentation Process*. Academic Press, New York.
- Irawadi, T.T. 1991.** Produksi enzim ekstraseluler dan *Neurospora sitophila* pada substrat limbah padat kelapa sawit. Disertasi Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- James, E.K., F.L. Olivares, A.L.M. de Oliveira, F.B. dos reis Jr., L.G. da Silva, and V.M. Reis. 2001.** Further observations on the interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse condition. *Journal of Experimental Botany* 52:747-760.
- Kirchhof, G., V.M. Reis, J.I. Baldani, B. Eckert, J. Dobereiner, and A. Hartman. 1997.** Occurrence, physiological, and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil* 194:45-55.
- Kulp, K. 1975.** Carbohydrases. In G. Reed (*Ed.*). *Enzyme and Food Processing*. Academic Press, New York.
- Mandel, M., R Andreotti, and C. Roche. 1976.** Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng Symp.* No. 26:21-33.
- Scope, R. 1982.** Protein purification: Principle and practice. Springer-Verlag, New York.
- Sen, S., T.K. Abraham, and S.I. Chakrabarty, 1982.** Characteristic of the cellulase produce by *Myceliophthora thermophila* D-14. *Can. J. Microbiol.* 28:271.