

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Karakterisasi Nodul Akar Kedelai Edamame

Nodul akar merupakan organ simbiosis yang mempunyai kemampuan untuk memfiksasi N_2 dari udara bebas sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman *leguminosa*. Sumber nodul akar pada penelitian ini diperoleh dari akar tanaman kedelai Edamame hasil penelitian Mulyono yang ditanam di tanah Regosol lahan percobaan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Pengamatan karakteristik nodul akar Edamame meliputi jumlah nodul, diameter nodul, bobot nodul dan efektifitas nodul. Sumber nodul akar Edamame yang diamati berasal dari 5 tanaman yang berbeda. Mula-mula dilakukan pengamatan jumlah nodul setiap tanaman. Kemudian dilakukan pengukuran diameter nodul menggunakan jangka sorong. Setelah itu, nodul ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui bobotnya. Lalu dilakukan pengamatan efektifitas nodul dengan membelah nodul tersebut. Nodul Edamame yang efektif akan berwarna kemerahan sedangkan yang tidak efektif akan berwarna putih pucat. Hal ini sesuai dengan pendapat Buchanan & Gibbans (1974) menyatakan bahwa nodul akar yang efektif berwarna merah. Warna merah tersebut akibat aktivitas bakteri *Rhizobium* sp. yang membentuk *leghaemoglobin* yang mengandung zat besi. *Leghaemoglobin* berfungsi untuk mengatur oksigen karena proses penambatan Nitrogen bersifat peka oksigen. Jumlah Leghemoglobin di dalam nodul akar memiliki hubungan langsung dengan jumlah nitrogen yang difiksasi. Hasil pengamatan karakteristik nodul awal kedelai Edamame tersaji pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik nodul awal kedelai Edamame

Karakter nodul	Kedelai Edamame
Jumlah nodul	2,00
Diameter (cm)	0,38
Berat (g)	0,26
Persentase efektif (%)	46,66

Menurut Agung Astuti dkk. (2006), nodul kedelai Edamame memiliki ciri-ciri berbentuk *irregular*, diameter 0,30 – 0,89, berat 0,82, persentase efektifitas 71,20% tetapi pada penelitian ini terdapat perbedaan pada berat dan persentase efektif nodul. Hal ini diduga dikarenakan faktor lingkungan antar penelitian yang dilakukan tersebut berbeda sehingga berpengaruh terhadap nodulasi akar.

B. Isolasi dan Pemurnian *Rhizobium* sp. dari Nodul Akar Edamame

Isolat *Rhizobium* sp. yang murni didapatkan dengan memisahkan antara *Rhizobium* sp. dari nodul akar dan lingkungan sekitarnya dengan menggunakan metode permukaan (*surface plating method*) dan menumbuhkannya sebagai biakan murni menggunakan metode goresan (*streak plating method*) (Jutono, 1980). Mula-mula *plating* awal dari sumber nodul didapatkan 6 jenis isolat berbeda berdasarkan bentuk dan warnanya. Hasil *plating* awal nodul akar Edamame kemudian dilakukan *re-plating* untuk karakterisasi koloni bakteri tersebut dan memastikan bahwa koloni tersebut benar-benar murni. Biakan murni tersebut kemudian disimpan dalam medium YMA miring.

1. Karakterisasi koloni bakteri *Rhizobium* sp.

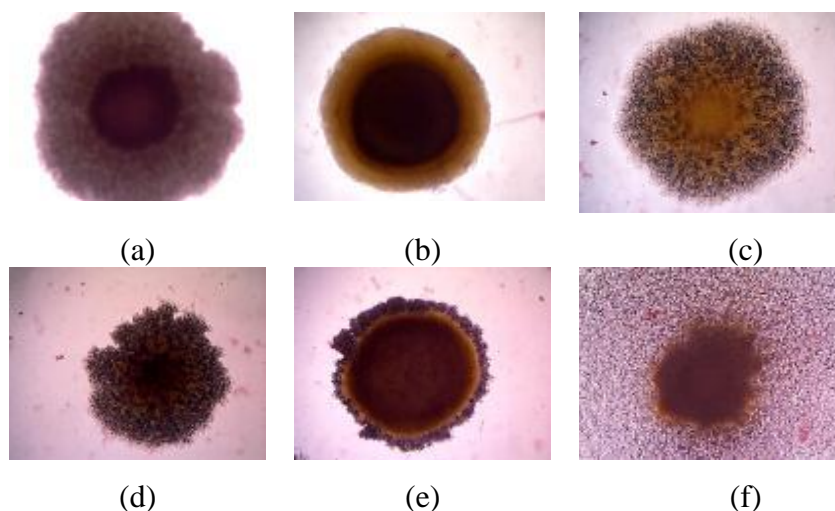
Pengamatan karakteristik koloni merupakan tahapan awal dalam tahapan proses identifikasi bakteri. Jutono (1980) menjelaskan bahwa untuk dapat mengidentifikasi dan determinasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi perlu ditentukan morfologi individu, sifat-sifat pengecatan, morfologi koloni, sifat-sifat biokimia dan fisiologi. Dari 6 isolat yang telah dimurnikan maka dilakukan deskripsi menurut karakteristik bentuk koloni, diameter koloni, elevasi, bentuk tepi, struktur dalam dan warna. Deskripsi koloni 6 isolat bakteri *Rhizobium* sp. dari nodul kedelai Edamame tersaji pada tabel 2.

Berdasarkan deskripsi koloni 6 isolat *Rhizobium* sp. nodul kedelai Edamame (tabel 2) menunjukkan bahwa warna keseluruhan isolat berwarna *pink*. Hal ini dikarenakan pada media YMA diberikan tambahan indikator *Congo red* sehingga *Rhizobium* sp. yang tumbuh berwarna *pink* atau merah muda. Warna *pink* tersebut menandakan bahwa *Rhizobium* sp. tidak menyerap warna merah. Hal yang hampir sama dijelaskan oleh Purwaningsih (2004) bahwa ciri-ciri bakteri *Rhizobium* adalah bulat dengan permukaan seperti kubah atau kerucut, dan

berwarna putih seperti susu atau jernih seperti air, serta tidak menyerap warna merah. Visualisasi koloni *Rhizobium* sp. tersaji pada gambar 1.

Tabel 2. Deskripsi koloni 6 isolat *Rhizobium* sp. nodul kedelai Edamame

Isolat	Warna	Bentuk	Diameter	Elevasi	Bentuk Tepi	Struktur Dalam
A	<i>Pink</i>	<i>Circular</i>	0,1 cm	<i>Low convex</i>	<i>Erose</i>	<i>Translucent</i>
B	<i>Pink</i>	<i>Circular</i>	0,1 cm	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>
C	<i>Pink</i>	<i>Circular</i>	0,3 cm	<i>Umbonate</i>	<i>Lacerate</i>	<i>Filamentous</i>
D	<i>Pink</i>	<i>Circular</i>	0,2 cm	<i>Convex</i>	<i>Lacerate</i>	<i>Arboroscent</i>
E	<i>Pink</i>	<i>Circular</i>	0,2 cm	<i>Conver papillate</i>	<i>Lobate</i>	<i>Finely granular</i>
F	<i>Pink</i>	<i>Circular</i>	0,2 cm	<i>Umbonate</i>	<i>Lacerate</i>	<i>Filamentous</i>



Gambar 1. Koloni *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat B (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

Menurut Elkan (1987), tipe pertumbuhan *Rhizobium* sp. dapat diketahui dari ukuran koloni. Koloni ukuran 1 mm atau lebih termasuk dalam tipe pertumbuhan *slow growing* sedangkan ukuran 4 – 6 mm termasuk dalam *fast growing*. Berdasarkan pendapat tersebut diduga 6 isolat tersebut termasuk dalam tipe pertumbuhan *slow growing* karena memiliki ukuran antara 1-3 mm. Elkan (1987) juga menjelaskan bahwa *Rhizobium* sp. pada umumnya berkoloni kecil, meskipun ada yang berbentuk koloni besar. Hasil isolasi didapatkan bentuk koloni *Circular* dengan bentuk tepi *Entire, Erose, Lacerate, Lobate* dengan diameter 0,1 - 0,3 cm.

Struktur dalam koloni *Rhizobium* sp. kedelai Edamame pada penelitian ini terdapat persamaan dan perbedaan dengan struktur dalam *Rhizobium* sp. Secara umum struktur dalam *Rhizobium* sp. menurut Elkan (1987) adalah *Opaque* dan *Transclulent*. Sedangkan isolat *Rhizobium* sp. Edamame pada penelitian ini terdapat persamaan yaitu isolat A dan B memiliki struktur dalam *Opaque* dan *Transclulent*. Perbedaan struktur dalam terdapat pada isolat C, isolat D, isolat E, dan isolat F yaitu *Filamentous*, *Arboroscent*, dan *Finely granular*. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh strain isolat *Rhizobium* sp. pada penelitian ini berbeda dengan strain *Rhizobium* sp. yang telah diteliti oleh Elkan (1987).

Elkan (1987) menyebutkan bahwa *Rhizobium* sp. secara umum memiliki bentuk elevasi datar (*flat*) sampai cembung (*convex*) dan kerucut (*umbonate*). Hal ini sesuai dengan bentuk elevasi pada isolat B (*convex*), isolat C (*umbonate*), isolat D (*convex*) dan isolat F (*umbonate*). Namun juga terdapat perbedaan elevasi pada isolat A (*Law convex*) dan isolat E (*Conver papillate*). Perbedaan ini kemungkinan disebabkan strain isolat *Rhizobium* sp. pada penelitian ini berbeda dengan strain *Rhizobium* sp. yang telah diteliti oleh Elkan (1987) serta menunjukkan karakteristik khusus dari kedelai Edamame di tanah Regosol.

2. Karakterisasi bentuk sel dan sifat gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan bakteri ke dalam dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rostinawati (2008) yang menyatakan bahwa pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pewarnaan gram juga sebagai penentuan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri.

Dinding sel bakteri gram positif tersusun atas lapisan Peptidoglikan homogen yang memiliki ketebalan sekitar 20 – 80 nm dan terletak di luar lapisan membran plasma. Sementara bakteri gram negatif ketebalan lapisan peptidoglikannya antara 2 – 7 nm dan dilapisi oleh membran luar dengan ketebalan 7 – 8 nm. Lapisan Peptidoglikan yang terdapat pada lapisan dinding sel bakteri Gram Positif lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri Gram Negatif. Menurut Brooks *et al.*, (2005), bakteri gram positif memiliki unsur khusus yaitu *Teichoic* sebanyak 5% dari berat kering dinding sel. Unsur ini memiliki fungsi

untuk menjaga transportasi ion, integritas dinding sel, penggantian *Choline* oleh *Elhanolamine* sehingga resisten terhadap autolisis dan menjaga permeabilitas eksternal. Bakteri gram positif akan memberikan warna ungu ketika diberikan pewarnaan gram. Sedangkan Gram Negatif akan memberikan warna merah ketika diberi pewarnaan gram. Ketika suspensi dilarutkan pada kristal violet dan iodin, warna ungu dari larutan kristal violet ini akan ditahan oleh struktur Peptidoglikan bakteri dan larutan Iodin. Kemudian ketika disirami alkohol yang bisa menghapus zat warna ungu dari kristal violet. Hal tersebut dikarenakan oleh pori-pori Peptidoglikan yang sempit ditambah oleh adanya iodin sehingga zat warna ungu tersebut sulit untuk terhapus oleh alkohol maka akan tetap terlihat berwarna ungu. Struktur pori Peptidoglikan pada bakteri gram negatif yang lebih besar akan menyebabkan zat warna ungu yang ada di Peptidoglikan lebih mudah ternetralisir atau terhapus oleh larutan alkohol sehingga akan terlihat warna *pink* setelah pemberian Safranin (Willey *et al.*, 2008).

Secara umum sel *Rhizobium* sp. merupakan bakteri gram negatif dengan diameter 0,5 – 0,9 μm panjang 1,2 – 3,0 μm dan tidak membentuk spora (Elkan, 1987). Untuk memastikan isolat pada tabel 2 benar-benar merupakan isolat *Rhizobium* sp. maka dilanjutkan dengan uji sel yaitu berdasarkan bentuk dan sifat gram sehingga hasil cat gram tersaji pada tabel 3.

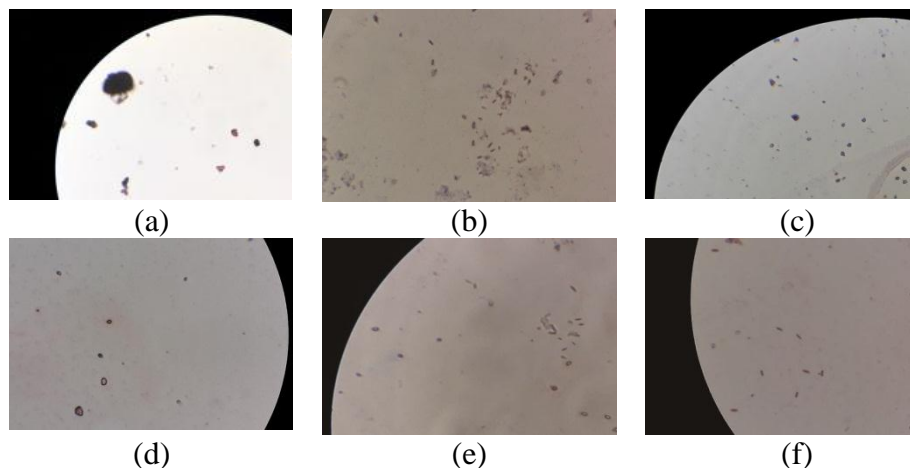
Tabel 3. Sifat gram dan bentuk sel isolat *Rhizobium* sp. nodul kedelai Edamame

Isolat	Bentuk Sel	Sifat Gram
A	Kokus	Negatif
B	Basil	Negatif
C	Kokus	Negatif
D	Kokus	Negatif
E	Basil	Negatif
F	Basil	Negatif

Hasil cat gram pada tabel 3 menunjukkan bahwa semua isolat merupakan bakteri Gram Negatif. Hal ini disebabkan karena bakteri kehilangan warna pada saat pewarnaan kristal violet pada saat pembilasan dengan alkohol, namun mampu menyerap warna tandingan yaitu pewarnaan Safranin. Bakteri gram negatif mengandung lipid dalam prosentase lebih tinggi daripada yang dikandung oleh

bakteri gram positif, dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis dibandingkan dengan dinding sel gram positif (Pelczar & Chan, 1986).

Pada tabel 2 juga menunjukkan bentuk sel isolat *Rhizobium* sp. nodul kedelai Edamame. Isolat A, isolat C, isolat D memiliki bentuk sel kokus sedangkan isolat B, isolat E dan isolat F memiliki bentuk sel basil (gambar 2). Setiap mikroba membutuhkan nutrisi yang spesifik untuk pertumbuhannya, sehingga perbedaan nutrisi yang digunakan akan mempengaruhi pertumbuhannya sehingga tidak tumbuh seperti pertumbuhan pada umumnya. Dwijoseputro (2005) menyatakan bahwa bentuk tubuh (sel) bakteri dipengaruhi oleh keadaan medium tumbuhnya, dan Sutedjo *et al.* (1991) menambahkan, jika terlalu lama ditumbuhkan dalam media dengan pH yang tidak sesuai dengan habitat aslinya dapat menyebabkan perubahan warna gram pada bakteri.



Gambar 2. Hasil cat gram *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat B (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

Berdasarkan Jhon G. Holt *et al.* (1994), sifat sel *Rhizobium* sp. yaitu negatif dan berbentuk batang. Pendapat yang sama juga dikemukakan oleh Pelczar & Chan (1988) bahwa secara umum sel-sel bakteri *Rhizobium* sp. berbentuk batang, aerobik dan bersifat gram negatif. Jika dilakukan perbandingan antara hasil cat gram 6 isolat nodul kedelai Edamame dengan pendapat Holt *et al.*, (1994) dan Pelczar & Chan (1988) maka berbeda bentuk sel yang sesuai hanya 3 isolat yaitu isolat B, isolat E dan isolat F.

3. Uji Fisiologi dan Biokimia

Setelah dilakukan karakterisasi morfologi dan sel bakteri maka dilakukan uji fisiologis dan biokimia isolat meliputi : uji Aerobisitas, uji Katalase, uji

Fermentasi, uji Nitrifikasi dan uji Ammonia. Hasil uji fisiologis dan biokimia tersaji pada tabel 4 :

Tabel 4. Hasil uji fisiologis dan biokimia *Rhizobium* sp. nodul kedelai Edamame

Isolat	Aerobisitas	Katalase	Fermentasi			Nitrikasi	Ammonifikasi		
			Glukosa		Sukrosa			Amilum	
			Warna	Gas	Warna			Gas	Warna
A	Aerob	+	Kuning kemerahan (++)	+	Kuning kemerahan (+)	+	Kuning (+)	-	+
B	Aerob	+	Kuning kemerahan (+)	+	Kuning kemerahan (++)	+	Biru kehitaman (++++)	-	+
C	Aerob	+	Merah (-)	+	Kuning kemerahan (+++)	-	Kuning kecoklatan (+++)	-	+
D	Aerob	+	Kuning kemerahan (+++)	+	Kuning kemerahan (++)	+	Kuning (-)	-	+
E	Aerob	+	Kuning kemerahan (+)	+	Merah (-)	-	Biru kehitaman (++++)	-	+
F	Aerob	+	Kuning kemerahan (++)	+	Kuning kemerahan (++)	+	Kuning kecoklatan (+++)	-	+

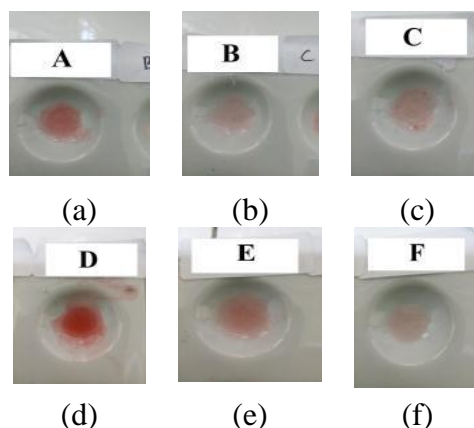
a) Uji Aerobisitas

Pengujian Aerobisitas bertujuan untuk mengetahui bakteri bersifat aerob, fakultatif anaerob atau aerob. Berdasarkan hasil pengamatan selama 48 jam terhadap ke enam isolat A, B, C, D, E dan F, didapatkan koloni bakteri tersebut berada pada permukaan medium nutrien cair. Oleh karena itu, koloni-koloni bakteri tersebut dapat dikatakan sebagai bakteri aerob (tabel 4). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan dari Puspitasari dkk., (2012) yang menyatakan bahwa letak koloni bakteri aerobik di dalam media cair akan berada pada bagian permukaan karena jenis bakteri aerobik memerlukan oksigen yang cukup banyak daripada jenis bakteri lainnya sebagai asektor pada proses fosforilasi oksidatifnya. Bakteri akan mendapatkan oksigen untuk respirasi apabila berada di daerah permukaan yang terpapar langsung dengan udara (Hidayah & Maya, 2012). Hal ini sejalan dengan pendapat Pelczar & Chan (1988) yang menyebutkan bahwa

secara umum sel-sel bakteri *Rhizobium* sp. berbentuk batang, aerobik dan bersifat gram negatif.

b) Uji Katalase

Uji Katalase dilakukan pada isolat untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim Katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Enzim Katalase merupakan enzim yang mampu mengkatalis langsung konversi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang toksik bagi sel menjadi air dan oksigen. Uji Katalase dilakukan dengan meneteskan 1 - 2 tetes H_2O_2 pada kultur bakteri yang berumur 48 jam. Reaksi positif uji Katalase ditunjukkan dengan membentuk gelembung-gelembung, yang berarti ada pembentukan gas O_2 , sehingga reaksi uji Katalase terbentuk gelembung udara yang berarti terbentuk gas. Visualisasi uji Katalase *Rhizobium* sp. nodul akar kedelai Edamame tersaji pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji Katalase *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat b (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

Berdasarkan tabel 4 didapatkan bahwa semua isolat *Rhizobium* sp. nodul akar kedelai Edamame menunjukkan hasil positif ketika direaksikan dengan hidrogen peroksida sehingga menghasilkan gelembung gas. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim Katalase. Bakteri aerob dan fakultatif akan mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dalam proses metabolismenya. Hal ini disebabkan oleh enzim Katalase yang ada pada bakteri. Enzim Katalase dapat menguraikan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi sel dan menghasilkan gas oksigen dan air sesuai reaksi (Pelczar & Chan, 2006). Selama

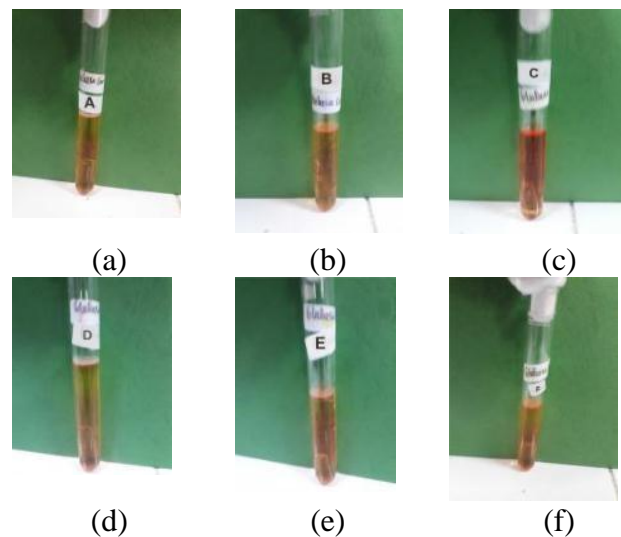
respirasi aerobik (proses fosforilasi oksidatif), mikroorganisme menghasilkan hidrogen peroksida, bahkan ada yang menghasilkan superoksida yang sangat beracun. Senyawa ini dihasilkan oleh mikroorganisme aerobik, fakultatif aerob maupun mikroaerofilik yang menggunakan jalur respirasi aerobik.

c) Uji Fermentasi

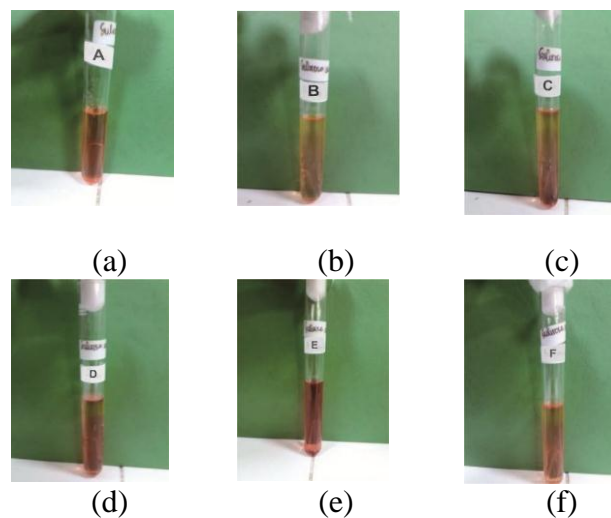
Uji Fermentasi bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk menghasilkan bahan-bahan yang digunakan dalam proses fotosintesis tanaman dan juga untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam merubah Amilum, Glukosa, dan Sukrosa sebagai cadangan makanan energi bagi bakteri. Uji fermentatif ini dilakukan dengan mengamati perubahan warna dan ada tidaknya gas pada masing-masing isolat yang diujikan pada glukosa, sukrosa, dan amilum. Apabila terjadi perubahan warna menandakan bakteri tersebut dapat menghasilkan asam, sedangkan apabila terbentuk gelembung menandakan bahwa bakteri tersebut mampu mereduksi CO₂ sebagai bahan makanan untuk proses fotosintesis yang nantinya digunakan bakteri sebagai bahan makanan. Uji isolat ini tampak perbedaan fisiologis yaitu isolat yang satu dengan lainnya. Perbedaan warna dan terbentuknya gas pada masing-masing isolat juga mengalami perbedaan. Hasil uji fermentatif tersaji pada tabel 4.

Uji fermentatif pada tabel 4 menunjukkan bahwa tiap bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda dalam memfermentasi glukosa, sukrosa dan amilum. Isolat A pada uji amilum berwarna kuning (1+), sukrosa berwarna kuning kemerahan (1+) dan terbentuk gas (+), serta glukosa berwarna kuning kemerahan (2+) dan terbentuk gas (+). Isolat B pada uji amilum berwarna biru kehitaman (4+), sukrosa berwarna kuning kemerahan (2+) dan terbentuk gas (+), serta glukosa berwarna kuning kemerahan (1+) dan terbentuk gas (+). Isolat C pada uji amilum berwarna kuning kecoklatan (3+), sukrosa berwarna kuning kemerahan (3+) dan tidak terbentuk gas (-), serta glukosa berwarna merah (-) dan terbentuk gas (+). Isolat D pada uji amilum berwarna kuning (-), sukrosa berwarna kuning kemerahan (2+) dan terbentuk gas (+), serta glukosa berwarna kuning kemerahan (3+) dan terbentuk gas (+). Isolat E pada uji amilum berwarna biru kehitaman (4+), sukrosa berwarna merah (-) dan tidak terbentuk gas (-), serta glukosa berwarna kuning kemerahan (1+) dan terbentuk gas (+). Isolat E pada uji amilum

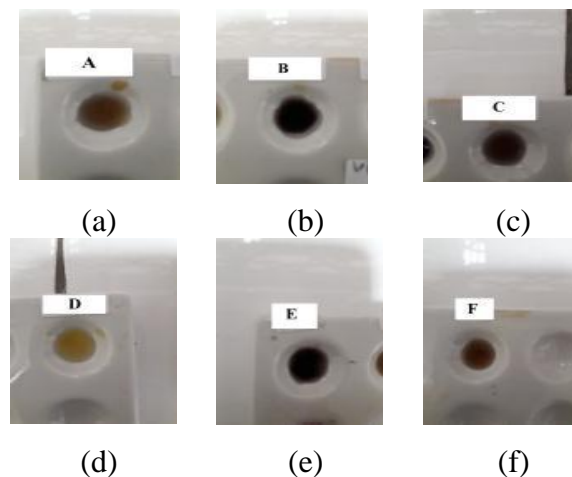
berwarna kuning kecoklatan (3+), sukrosa berwarna kuning kemerahan (2+) dan terbentuk gas (+), serta glukosa berwarna kuning kemerahan (2+) dan terbentuk gas (+). Perubahan warna dan adanya gelembung udara yang terbentuk dalam tabung durham menandakan bahwa bakteri *Rhizobium* sp. mengalami Fermentasi dan membutuhkan energi dari karbohidrat untuk bertahan hidup. Perubahan warna yang terjadi pada tabung reaksi dengan jenis gula yang berbeda menandakan penurunan pH menjadi lebih asam, dan adanya proses Fermentasi dari mikroba tersebut untuk bertahan hidup dan mendapatkan energi (Lay, 1994). Visualisasi uji Fermentasi glukosa tersaji pada gambar 4, sukrosa tersaji pada gambar 5 dan amilum tersaji pada gambar 6.



Gambar 4. Hasil uji Fermentasi glukosa pada *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat b (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)



Gambar 5. Hasil uji Fermentasi sukrosa pada *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat b (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

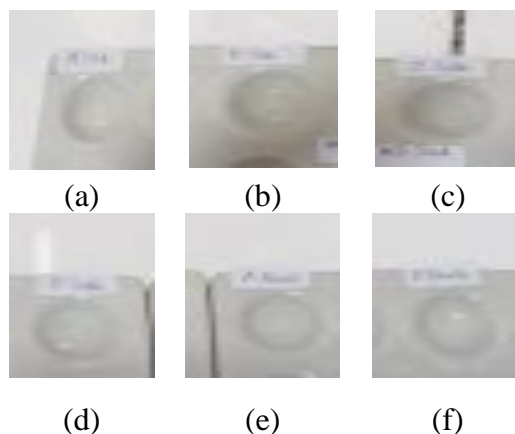


Gambar 6. Hasil uji Fermentasi Amilum pada *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat b (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

Pada tabel 4 dapat dilihat bahwa dari keenam isolat yang memiliki sifat fermentatif yang kuat adalah isolat F. Sedangkan sifat fermentatif yang lemah terdapat pada isolat D. Sebagian besar mikroorganisme memperoleh energi dari substrat berupa karbohidrat yang selanjutnya difermentasi menghasilkan asam-asam organik (seperti asam Laktat, Format, Asetat), dengan disertai atau tidak disertai pembentukan gas. Organisme-organisme yang berbeda akan menggunakan karbohidrat/gula-gula yang berbeda tergantung dari komponen enzim yang dimilikinya.

d) Uji Nitrifikasi

Uji Nitrifikasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit. Keberadaan nitrit dalam media diuji dengan penambahan asam Sulfanilat dan α -Naftilamin yang akan bereaksi dengan nitrit yang ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah atau merah muda (Cappuccino & Sherman, 1983). Kelompok bakteri yang dapat mengubah senyawa Nitrat menjadi Nitrit yang pada umumnya berlangsung secara aerob di dalam tanah. kelompok bakteri ini bersifat kemolitotrof karena menggunakan senyawa Nitrogen anorganik sebagai siklus hidupnya. Nitrogen ini memerlukan senyawa karbon dioksida sebagai sumber karbonnya yang diikat dalam siklus Calvin. Pada umumnya, bakteri Nitrifikasi bersifat non motil (tidak dapat bergerak) sehingga cenderung melekat pada permukaan benda yang ada di sekelilingnya.

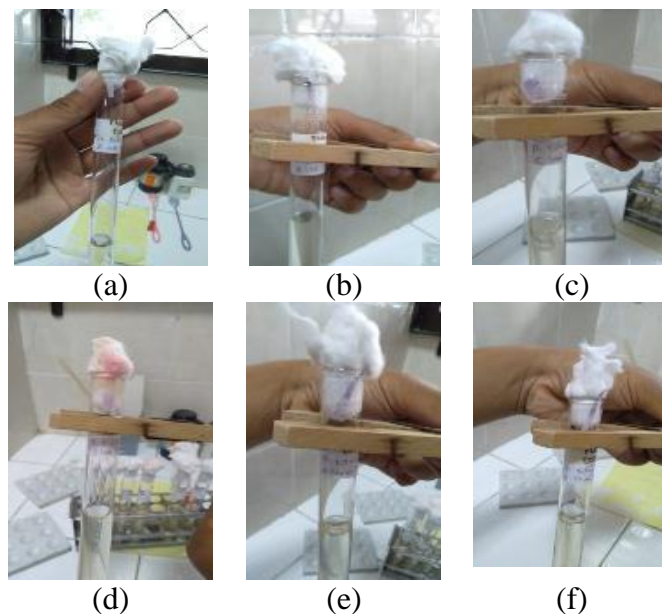


Gambar 7. Hasil uji Nitrifikasi *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat b (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

Berdasarkan tabel 4, semua isolat yang diuji menunjukkan hasil negatif karena tidak adanya perubahan warna menjadi warna merah (gambar 7). Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Reduksi nitrat terjadi pada kebanyakan bakteri anaerob fakultatif. Sedangkan berdasarkan uji Aerobisitas menunjukkan bahwa semua isolat termasuk ke dalam bakteri aerob. O_2 dapat menghambat reduksi nitrat sehingga dalam reaksi, O_2 dihabiskan kemudian menggunakan nitrat pada bakteri anaerob (Lay, 1994).

e) Uji Ammonia

Uji Ammonia dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi Ammonia. Untuk menguji isolat terhadap kemampuan Amonifikasi maka dilakukan pengujian pada pertumbuhan bakteri di medium Nitrat Cair yang dipanaskan selama 5 menit. Hasil positif terbentuknya gas Ammonia maka akan timbul pewarnaan biru pada kertas lakmus merah. Pemanasan yang dilakukan berfungsi untuk mempercepat penguapan gas NH_3 (Ammonia). Ammonia merupakan senyawa yang terdiri atas unsur nitrogen dan hidrogen serta dikenal memiliki bau menyengat yang khas. Setelah dihasilkan gas NH_3 dari pembakaran, maka terjadi perubahan pH kearah lebih basa karena NH_3 merupakan zat yang bersifat basa di dalam air (Petrucci, 2011). Rusmana & Nedwell (2004) menyatakan bahwa tipe metabolisme respirasi dan reduksi nitrat menjadi amonium dilakukan oleh kelompok bakteri dengan tipe metabolisme fermentatif. Visualisasi hasil uji Ammonia terhadap 6 isolat tersaji pada gambar 8.



Gambar 8. Hasil uji Ammonia *Rhizobium* sp. isolat A (a), isolat b (b), isolat C (c), isolat D (d), isolat E (e) dan isolat F (f)

Hasil uji Ammonia pada tabel 4 menunjukkan bahwa isolat A, B, C, D, E dan F mampu menghasilkan Ammonia yang ditunjukkan oleh perubahan warna kertas lakmus (gambar 8). Hal ini sejalan dengan Chang (2009) yang menyatakan bahwa gas NH_3 (Ammonia) yang dihasilkan dapat kita deteksi dari karakteristik baunya yang menyengat atau dengan meletakkan kertas lakmus merah di permukaan tabung reaksi yang akan berubah menjadi berwarna biru. Seperti yang kita ketahui, NH_3 (Ammonia) memiliki ciri-ciri berbau menyengat, tidak berwarna, mudah menguap (*volatile*), dapat membirukan lakmus merah (bersifat basa), dan merupakan gas yang reaktif (Chang, 2009).

C. Re-Inokulasi antara Isolat *Rhizobium* sp. dengan Kedelai Edamame.

Re-inokulasi merupakan pemberian isolat terpilih dari hasil isolasi *Rhizobium* sp. pada kedelai Edamame. Tujuan re-inokulasi yaitu untuk melakukan pengujian efektifitas dan kompatibilitas bakteri *Rhizobium* sp. terhadap pertumbuhan tanaman kedelai Edamame. Berdasarkan identifikasi koloni, bentuk sel dan sifat gram serta uji fisiologi dan biokimia pada ke enam isolat terdapat kesamaan pada hasil uji –uji yang dilakukan. Sehingga pada tahapan re-inokulasi dilakukan *screening* isolat dari 6 isolat berdasarkan ciri-ciri bakteri *Rhizobium* sp. pada *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*. Berdasarkan *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* yang menjelaskan bahwa sifat sel

Rhizobium sp. yaitu negatif dan berbentuk batang. Dari 6 isolat tersebut yang sesuai dengan ciri-ciri *Rhizobium* sp. pada *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* adalah isolat B, E dan F. Sehingga hasil *screening* 6 isolat didapatkan 3 isolat (Isolat B, Isolat E dan Isolat F) yang digunakan untuk re-inokulasi dan ditambah dengan isolat campuran (gabungan Isolat B, Isolat E dan Isolat F) sebagai kontrol.

1. Dinamika bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol

Rata-rata jumlah *Rhizobium* sp. yang didapatkan adalah 70×10^7 CFU/ml. Hasil perhitungan dijadikan untuk menghitung volume inokulum yang diberikan pada tanaman. Karakterisasi yang dilakukan didapatkan bahwa isolat B, E dan F berwarna *pink*, bentuk *Circular*, diameter 0,1-0,2 cm, elevasi *Convex*, *Conver papillate* dan *Umbonate*, bentuk tepi *Entire*, *Lobate* dan *Lacerate*, struktur dalam *Opaque*, *Finely granular* dan *Filamentous*, gram negatif dan bentuk sel basil. Dinamika bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol pada nodul akar dihitung dengan melakukan *plating* nodul akar kedelai Edamame pada setiap perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali. Hasil perhitungan dinyatakan dalam satuan CFU/ml. Rerata jumlah bakteri tersaji pada tabel 5.

Tabel 5. Jumlah populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol pada minggu ke-3, 6, dan 9

Perlakuan	Minggu ke-3 ($\times 10^7$ CFU/ml)	Minggu ke-6 ($\times 10^7$ CFU/ml)	Minggu ke-9 ($\times 10^7$ CFU/ml)
Isolat B	1,67b	5,43a	3,27b
Isolat E	1,33b	7,67a	3,63b
Isolat F	4,43a	4,20a	2,53b
Isolat B, E, F	5,10a	7,53a	8,60a

Keterangan: angka rerata yang diikuti dengan huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji F dengan taraf $\alpha = 5\%$

Hasil sidik ragam dinamika bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol menunjukkan bahwa semua perlakuan memberikan pengaruh yang nyata pada minggu ke-3 dan minggu ke-9 dan tidak memberikan pengaruh nyata pada minggu ke-6 (lampiran 7.a, lampiran 7.b dan lampiran 7.c). Rerata dinamika populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol disajikan pada tabel 5.

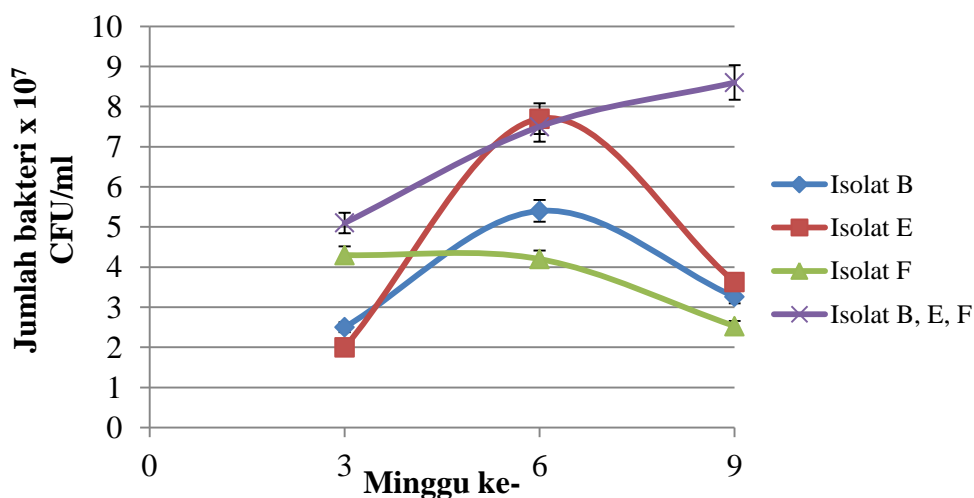
Pada minggu ke-3 jumlah bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol berkisar antara $1,67 - 5,10 \times 10^7$ CFU/ml. Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan isolat campuran berbeda nyata terhadap isolat B dan isolat E namun tidak berbeda nyata dengan isolat F. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian inokulum isolat B, E dan F maupun isolat campuran mampu berasosiasi dengan tanaman kedelai Edamame sehingga menambah jumlah bakteri yang terdapat pada nodul akar. Perlakuan tertinggi ditunjukkan oleh pemberian inokulum isolat campuran dengan nilai $5,10 \times 10^7$ CFU/ml. Sedangkan perlakuan terendah terdapat pada inokulum isolat C dengan nilai $1,33 \times 10^7$ CFU/ml. Pada minggu ke-6 rerata jumlah bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol berkisar antara $4,20 - 7,53 \times 10^7$ CFU/ml. Pada minggu semua perlakuan isolat tunggal maupun campuran yang diberikan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah populasi *Rhizobium indigenus* Regosol. Kemudian pada minggu ke-9 pemberian inokulum menunjukkan pengaruh nyata terhadap jumlah populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol. Perlakuan tertinggi ditunjukkan oleh inokulum campuran dengan nilai $8,60 \times 10^7$ CFU/ml. Sedangkan perlakuan terendah terdapat pada inokulum isolat C dengan nilai $2,53 \times 10^7$ CFU/ml namun tidak berbeda nyata dengan pemberian inokulum isolat A dan B. Dinamika populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol selama 9 minggu disajikan pada gambar 9.

Pada minggu ke-3, populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol menunjukkan pertumbuhan yang pesat pada perlakuan inokulum isolat F serta perlakuan inokulum campuran. Pada perlakuan pemberian inokulum isolat B dan inokulum isolat E menunjukkan pertumbuhan yang tidak pesat. Pada minggu ini terjadi fase lag dimana bakteri akan menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Inokulum isolat F dan campuran mampu beradaptasi dengan baik pada fase ini sedangkan inokulum isolat B dan E kurang mampu beradaptasi dengan lingkungan.

Pada minggu ke-6 menunjukkan bahwa jumlah bakteri mengalami perubahan yang berbeda antar perlakuan. Pemberian inokulum isolat B, isolat E dan inokulum isolat campuran terjadi kenaikan jumlah populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol. Minggu ke-6 bakteri mengalami fase log yakni bakteri mengalami pertumbuhan yang cepat. Kusnadi dkk. (2003) menjelaskan bahwa selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat

diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan percepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Faktor lain yang mempengaruhi populasi bakteri dalam tanah adalah pH, praktik pertanian, pemupukan dan pemakaian pestisida juga penambahan bahan organik (Mujiyati & Supriyadi, 2009). Namun inokulum isolat F menunjukkan penurunan jumlah populasi bakteri. Hal ini diduga Isolat F kurang memiliki kecocokan dengan makanannya yaitu fotosintat yang dihasilkan oleh tanaman kedelai Edamame.

Pada minggu ke-9 jumlah populasi bakteri menunjukkan jumlah populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol yang mengalami penurunan, kecuali pada perlakuan pemberian inokulum campuran. Penurunan ini diduga karena bakteri mengalami fase stasioner dimana pertumbuhannya yang mulai melambat akibat jumlah bakteri yang mati lebih banyak daripada yang hidup. Hal ini disebabkan karena produksi nutrient yang kurang dan faktor lain yang tidak diketahui. Di dalam bintil akar tidak hanya terdapat satu strain *Rhizobium* saja, mungkin dua atau lebih strain hidup bersama-sama di dalam satu bintil akar (Ramdana & Retno, 2015). Inokulum campuran mampu memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah populasi bakteri menunjukkan jumlah populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol. Hal ini diduga karena inokulum campuran mampu memanfaatkan hasil fotosintat dengan baik sehingga nutrient yang didapatkan menjadi tercukupi.



Gambar 9. Dinamika populasi bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol

2. Pengamatan nodul akar tanaman kedelai Edamame

Nodul yang terbentuk pada tanaman kedelai Edamame merupakan hasil interaksi antara bakteri *Rhizobium* sp. dengan tanaman kedelai sebagai inangnya. Tanaman kedelai termasuk dalam tanaman *Legume* yang memiliki ciri khas adanya simbiosis antara bakteri nodul akar dengan akar tanaman kedelai yang menyebabkan terbentuknya nodul akar (Adisarwanto, 2008). Nodul di alam terjadi karena adanya komunikasi molekular antara mikrosimbion (*Rhizobium*) dan makrosimbion (tanaman kacang-kacangan) yang merupakan suatu keharusan untuk saling mengenali calon mitra simbiosis yang kompatibel.

Untuk mengetahui pengaruh inokulum *Rhizobium* sp. dapat dilihat dari aktivitas nodulasi pada akar tanaman kedelai Edamame. Aktivitas nodulasi pada tanaman kedelai Edamame dapat dilihat dari jumlah nodul total, persentase nodul efektif, bobot nodul dan diameter nodul. Rerata komponen pengamatan pengaruh inokulasi *Rhizobium* sp. terhadap nodulasi kedelai pada minggu ke-9 disajikan pada tabel 6.

Tabel 6. Rerata jumlah nodul, persentase nodul efektif, bobot nodul dan diameter nodul pada minggu ke-9

Perlakuan	Jumlah nodul	Efektifitas nodul (%)	Bobot nodul (gram)	Diameter nodul (cm)
Isolat B	5,74a	54,75a	1,62a	0,33a
Isolat E	6,59a	48,39a	1,44a	0,31a
Isolat F	7,89a	62,90a	1,33a	0,32a
Isolat B, E, F	7,96a	62,90a	1,04a	0,25a

Keterangan: angka rerata yang diikuti dengan huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji F dengan taraf $\alpha = 5\%$

a) Jumlah nodul

Simbiosis antara *Rhizobium* sp. dengan akar tanaman legum akan menghasilkan organ penambat nitrogen yaitu nodul akar. Jumlah nodul akar pada tanaman kedelai Edamame sebagai indikator keberhasilan inokulasi inokulum *Rhizobium* sp. sekaligus dapat digunakan untuk menilai pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman kedelai. Semakin banyak nodul yang terbentuk, semakin banyak N_2 yang terfiksasi dan N yang dihasilkan, sehingga kandungan klorofil pada daun akan meningkat dan proses fotosintesis juga meningkat. Dengan demikian asimilat yang dihasilkan lebih banyak, akibatnya pertumbuhan tanaman lebih baik (Ramdana & Retno, 2015)

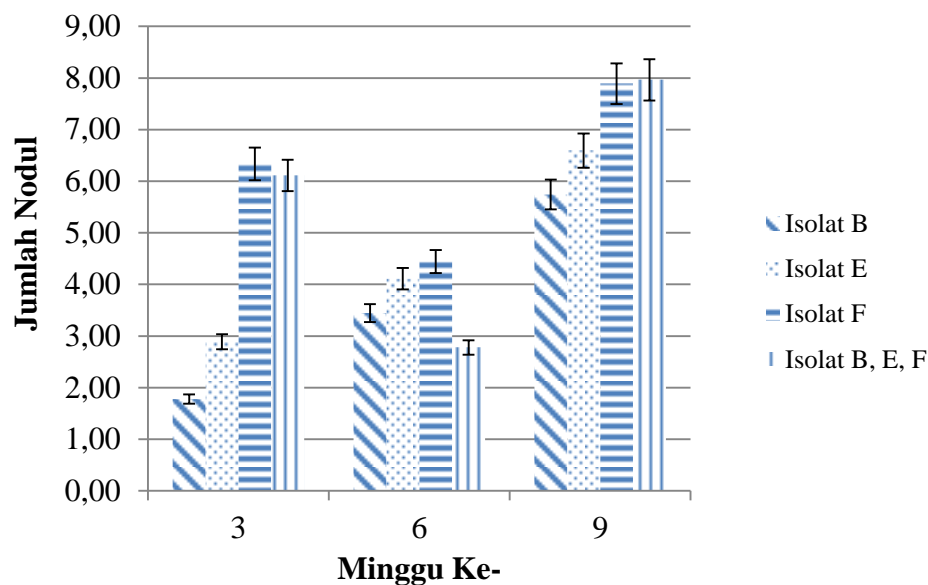
Hasil sidik ragam parameter jumlah nodul menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata (lampiran 7.d). Rerata jumlah nodul pada setiap perlakuan pada minggu ke-9 disajikan pada tabel 5. Nilai masing –masing perlakuan yaitu perlakuan inokulum isolat B sebanyak 5,74, perlakuan inokulum isolat E sebanyak 6,59, perlakuan inokulum isolat F sebanyak 7,89 dan perlakuan inokulum isolat campuran sebanyak 7,96.

Nodul akar terbentuk akibat adanya komunikasi molekular antara *Rhizobium* sebagai mikrosimbion dan tanaman kedelai Edamame sebagai makrosimbion. Pada minggu ke-9, pemberian inokulum campuran berpengaruh sama dengan inokulum dari isolat B, isolat E dan isolat F. Hal ini diduga karena kedelai Edamame mampu berasosiasi dengan semua inokulum isolat *Rhizobium* sp. yang diberikan sehingga terbentuk nodul pada perakaran tanaman. Ramdana & Retno (2015) menjelaskan bahwa inokulasi tanaman dengan strain rhizobia yang tepat akan menjamin terbentuknya bintil akar yang efektif mengikat N₂ udara.

Pada tabel 6 jumlah nodul kedelai Edamame dengan rerata berkisar antara 5,74 – 7,96 buah. Sedangkan pada nodul awal sebelum re-inokulasi (tabel 1) menunjukkan rerata jumlah nodul sebesar 2 buah. Hal ini menandakan bahwa rerata jumlah nodul hasil re-inokulasi lebih besar dibandingkan jumlah nodul awal sebelum re-inokulasi. Penelitian sebelumnya oleh Noveta (2007) menunjukkan rerata jumlah nodul kedelai adalah 16,89 buah. Hasil yang berbeda juga ditunjukkan oleh Raymond (2014) dalam penelitiannya yang menunjukkan rerata jumlah nodul yang diberikan inokulum berkisar antara 7,6 – 11 buah. Sedangkan menurut Noveta (2007) bahwa jumlah nodul dengan inokulasi sebesar 40-60 buah nodul. Jumlah nodul akar kedelai Edamame memiliki perbandingan yang lebih sedikit daripada jumlah nodul akar kedelai pada umumnya yang berkisar antara 5,74 – 7,96 buah. Kondisi lingkungan yang berbeda dapat berpengaruh terhadap jumlah populasi *Rhizobium* sp. dalam membentuk nodul di dalam tanah. Peng *et al.*, (2002) menyebutkan bahwa faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap *Rhizobium* yang diinokulasikan belum tentu berpengaruh sama terhadap *Rhizobium* endogen yang lebih adaptif terhadap lingkungannya. Perkembangan jumlah nodul akar selama 9 minggu tersaji pada gambar 10.

Pada gambar 10 menunjukkan bahwa jumlah nodul pada semua perlakuan

cenderung meningkat dari minggu ke-3 sampai minggu ke-9. Pada minggu ke-3 mulai terjadi pembentukan nodul pada akar kedelai Edamame. Adisarwanto (2005) menyatakan bahwa nodul akar tanaman kedelai terbentuk pada umur 4 - 5 hst yaitu sejak terbentuknya akar tanaman, dan dapat mengikat nitrogen dari udara pada umur 10 - 12 hst. Namun pada minggu ke-6 terjadi penurunan jumlah nodul pada perlakuan inokulum isolat F dan isolat campuran.



Gambar 10. Jumlah nodul akar Edamame

Hal ini diduga karena akibat pemberian pupuk nitrogen susulan yang menyebabkan terhambatnya pembentukan nodul pada akar tanaman. Hal ini sejalan dengan Idiyah (1997) yang menyebutkan bahwa pupuk urea yang diberikan dengan takaran tinggi akan menyebabkan aktifitas fiksasi biologis menjadi kurang efektif akibat aktivitas enzim terhambat dengan pemberian ammonium, asam amino atau amida. Sedangkan pada minggu ke-9 terjadi peningkatan jumlah nodul yang signifikan.

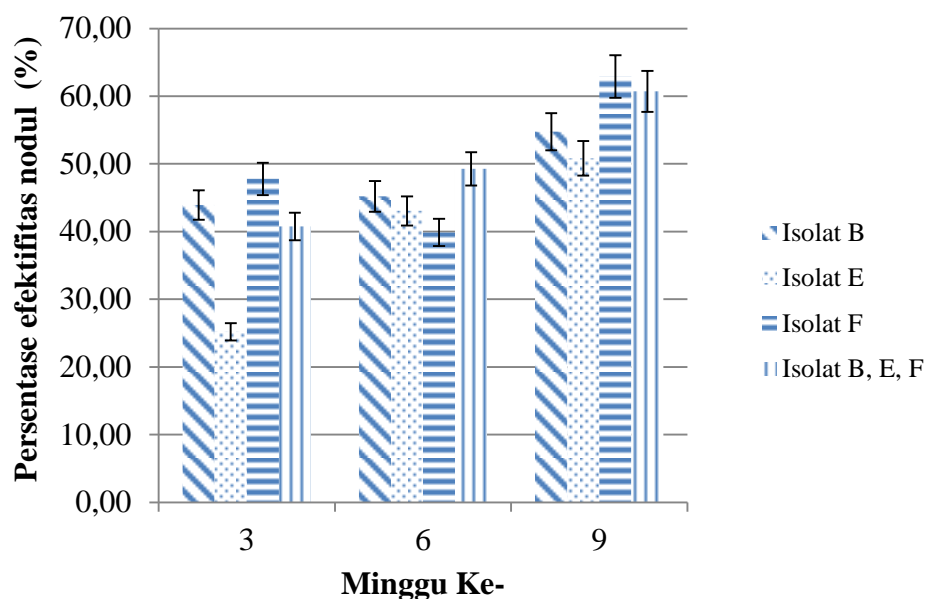
b) Persentase efektifitas nodul

Efektifitas nodul diamati dari warna kemerahan yang tampak pada nodul ketika dibelah. Warna merah tersebut akibat aktivitas bakteri *Rhizobium* sp. yang membentuk *leghaemoglobin* yang mengandung zat besi. *Leghaemoglobin* berfungsi untuk mengatur oksigen karena proses penambatan nitrogen bersifat peka oksigen. Yuwono (2006) menyebutkan bahwa *leghaemoglobin* bekerja dengan cara bergabung dengan oksigen sehingga membentuk *oxyhaemoglobin*.

Sehingga persentase nodul efektif tersebut dapat diartikan sebagai perbandingan nodul yang aktif menambat N dengan jumlah nodul total yang terdapat pada akar tanaman.

Hasil sidik ragam parameter persentase efektifitas nodul menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata (lampiran 7.e). Rerata persentase efektifitas nodul setiap perlakuan pada minggu ke-9 disajikan pada tabel 6. Nilai masing –masing perlakuan yaitu perlakuan inokulum isolat B (54,75%), perlakuan inokulum isolat E (48,39%), perlakuan inokulum isolat F (62,90%) dan perlakuan inokulum isolat campuran (60,71%).

Inokulan yang efektif mengandung *Rhizobium* sp. yang mampu menghasilkan bintil yang efektif pada tanaman inangnya. Pada tabel 6 rerata persentase efektif nodul berkisar antara 48,39 - 62,90 %. Sedangkan pada karakterisasi nodul awal sebelum re-inokulasi (tabel 1) menunjukkan rerata persentase efektifitas nodul sebesar 46,66 %. Hal ini menandakan bahwa rerata jumlah nodul hasil re-inokulasi lebih besar dibandingkan jumlah nodul awal sebelum dilakukan re-inokulasi. Pada minggu ke-9, pemberian inokulum campuran berpengaruh sama dengan inokulum dari isolat B, isolat E dan isolat F dalam hal efektifitas nodul. Hal ini diduga karena inokulan yang diberikan memiliki kecocokan dengan tanaman kedelai Edamame sehingga terjadi simbiosis yang efektif antara keduanya. Nodul yang efektif ditunjukkan dengan warna merah yang menandakan adanya kandungan *Leghaemoglobin* dan enzim nitrogenase yang memegang peranan penting dalam memfiksasi N₂. Persentase efektifitas nodul tergantung pada efektifitas masing-masing strain *Rhizobium* sp. dan kecocokan tanaman inang. Apabila terjadi kecocokan antara strain dengan tanaman inang, maka akan terjadi simbiosis yang efektif. Hubungan yang serasi akan menghasilkan bintil akar yang sangat efektif dalam menambat N udara (Yutono, 1985). Selain itu faktor lingkungan dan fisiologi juga sangat berpengaruh. Seperti yang dikatakan oleh Gibson (1981) bahwa pembentukan bintil akar yang baik dari hasil penambatan N pada akar tanaman legum merupakan suatu rangkaian yang kompleks dari proses fisiologi yang meliputi interaksi antara tanaman dengan strain yang diinokulasikan. Perkembangan persentase efektifitas nodul selama 9 minggu tersaji pada gambar 11.



Gambar 11. Persentase efektifitas nodul Edamame

Pada gambar 11 menunjukkan bahwa persentase efektifitas nodul pada semua perlakuan cenderung mengalami peningkatan dari minggu ke-3 sampai minggu ke-9. Pada minggu ke-3 sudah mulai terbentuk persentase nodul efektif pada akar kedelai Edamame. Hidayat (1985) menyebutkan bahwa pada umur 12-18 HST terjadi pertumbuhan lanjut jaringan bintil pada akar tanaman. Selain itu jaringan bintil akan berwarna merah akibat adanya kandungan *Leghaemoglobin* dan enzim *Nitrogenase* yang memegang peranan penting dalam memfiksasi N_2 . Pada minggu ke-6 terjadi kenaikan persentase efektif nodul kecuali pada pemberian inokulum isolat F yang mengalami penurunan namun tidak signifikan. Pada minggu ke-9 persentase efektifitas nodul kembali mengalami kenaikan yang signifikan pada semua perlakuan. Hal ini diduga karena pada minggu ke-9 nodul akar kedelai Edamame sedang pada masa aktifnya dalam memfiksasi nitrogen yang ditandai dengan banyaknya nodul yang berwarna merah ketika dibelah sehingga meningkatkan rerata persentase efektifitas nodul. Pengaruh pemberian inokulum juga dapat mengurangi laju penurunan jumlah bakteroid pada nodul akar. Nodul akar akan aktif hingga umur tanaman 50–60 hari dan akan menurun pada minggu ke-10. Hasil re-inokulasi pada parameter efektifitas yang memiliki kesamaan menunjukkan bahwa ketiga isolate terbukti kompatibel.

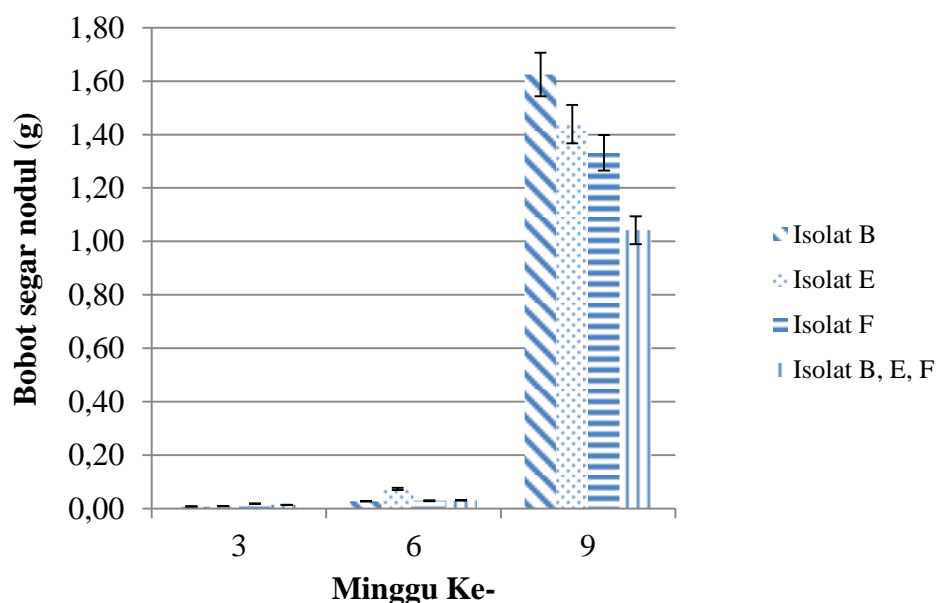
c) Bobot segar nodul

Bobot nodul merupakan salah satu parameter untuk mengukur tingkat keberhasilan inokulasi *Rhizobium* sp. dengan tanaman kedelai Edamame. Simbiosis antara *Rhizobium* sp. dengan akar tanaman legum akan menghasilkan organ penambat nitrogen yang disebut bintil/nodul akar. Pada nodul akar terdapat sel-sel yang agak membesar berisi bakteroid dan diantaranya terdapat sel-sel yang lebih kecil dan lebih banyak mengandung pati. Perkembangan bintil akar mulai terjadi pada saat sel korteks akar terangsang membelah secara mitotik membentuk calon bintil dan diikuti oleh masuknya bakteri *Rhizobium* kedalam sel-sel tersebut. Struktur nodul akar ditentukan oleh tanaman inang. Umumnya nodul akar terbentuk 4 - 5 hst yaitu sejak terbentuknya akar tanaman, dan dapat mengikat nitrogen dari udara pada umur 10 - 12 HST (Adisarwanto, 2005).

Hasil sidik ragam parameter bobot nodul menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata (lampiran 7.f). Rerata bobot nodul pada setiap perlakuan pada minggu ke-9 disajikan pada tabel 5. Nilai masing-masing perlakuan yaitu perlakuan inokulum isolat B (1,62 gram), perlakuan inokulum isolat E (1,44 gram), perlakuan inokulum isolat F (13,33 gram) dan perlakuan inokulum isolat campuran (1,04 gram).

Kemampuan *Rhizobium* sp. dalam menambat nitrogen dari udara dipengaruhi oleh besarnya nodul akar dan jumlah nodul akar pada tanaman. Semakin besar nodul akar atau semakin banyak nodul akar yang terbentuk, semakin besar nitrogen yang ditambat (Arimurti, 2000). Semakin aktif nitrogenase semakin banyak pasokan nitrogen bagi tanaman, sehingga akan berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman yang semakin baik (Martani & Margino, 2005). Pada tabel 6 rerata bobot segar nodul berkisar antara 1,04 – 1,62 gram. Sedangkan pada karakterisasi nodul awal sebelum re-inokulasi (tabel 1) menunjukkan rerata bobot segar nodul sebesar 0,26 gram. Hal ini menandakan bahwa rerata bobot segar nodul hasil re-inokulasi lebih besar dibandingkan jumlah nodul awal sebelum dilakukan re-inokulasi. Pada minggu ke-9, pemberian inokulum campuran berpengaruh sama dengan inokulum dari isolat B, isolat E dan isolat F dalam hal bobot segar nodul. Hal ini dikarenakan inokulan yang diberikan memiliki kesesuaian dengan tanaman kedelai Edamame sehingga terjadi simbiosis

yang efektif dalam meningkatkan bobot segar nodul. Jumlah N yang dapat difiksasi oleh tanaman legum sangat bervariasi, tergantung pada jenis tanaman legum, kultivar, jenis bakteri dan tempat tumbuh bakteri tersebut dan terutama pH tanah (Islami & Utomo, 1995). Pembentukan bintil akar diawali dengan sekresi produk metabolisme tanaman ke daerah perakaran (*nod factors*) yang menstimulasi pertumbuhan bakteri, berupa liposakarida (Burdas, 2002). Eksudat akar yang dihasilkan tanaman legum tersebut memberikan efek yang menguntungkan untuk pembelahan *Rhizobium* di tanah (Mulder & Woldendorp, 1969). Perkembangan bobot segar nodul selama 9 minggu tersaji pada gambar 12.



Gambar 12. Bobot segar nodul Edamame

Berdasarkan gambar 12 dapat diketahui bahwa bobot segar nodul pada semua perlakuan mengalami peningkatan dari minggu ke-3 sampai minggu ke-9. Pada minggu ke-3 sudah mulai terbentuk nodul pada akar kedelai Edamame namun banyak yang memiliki ukuran yang kecil. Nodul akar yang memiliki ukuran yang kecil menyebabkan rerata bobot nodul yang dihasilkan hanya berkisar 0,01-0,02 g/tanaman. Adisarwanto (2005) menyatakan bahwa nodul atau bintil akar tanaman kedelai terbentuk pada umur 4 - 5 hst yaitu sejak terbentuknya akar tanaman. Tanaman kedelai Edamame yang masih pada masa vegetatif tidak mempunyai atau sedikit mempunyai bintil akar, sedangkan memasuki masa generatif mulai membentuk banyak bintil akar. Pada minggu ke-6 nodul akar

kedelai Edamame mengalami sedikit kenaikan yang tidak signifikan. Hal ini dikarenakan umur tanaman yang sudah mulai masuk pada fase generatif yang ditandai dengan adanya bunga dan mulai terbentuknya polong. Umur nodul yang belum mencapai fase maksimal untuk berkembang berpengaruh terhadap rerata bobot nodul yang dihasilkan. Pada minggu ke-9 terjadi kenaikan rerata bobot nodul yang signifikan. Kenaikan ini diduga karena pada minggu ke-9 merupakan fase puncak dari perkembangan nodul baik dari jumlah maupun bobot segarnya.

Bintil akar yang telah dewasa terdiri atas daerah bakteroid yang dikelilingi beberapa lapisan korteks. Volume jaringan bakteroid 16 – 50% lebih besar pada bintil akar efektif daripada bintil akar tidak efektif. Volume jaringan bakteroid pada bintil akar efektif memiliki hubungan langsung yang positif dengan jumlah N yang difiksasi. Nodul akar yang tidak efektif biasanya berukuran kecil dan jaringan bakteroidnya tidak berkembang. Sebaliknya nodul yang efektif berukuran besar dan jaringan bakteroidnya berkembang dengan baik. Bakteroid bentuknya tidak teratur dan tidak mempunyai flagella dan dikelilingi oleh membran.

d) Diameter nodul

Diameter nodul digunakan untuk menguji kompatibilitas antara tanaman inang dengan *Rhizobium* sp. yang menginfeksi. Kompatibilitas yang baik antara *Rhizobium* sp. dan kedelai Edamame akan mengakibatkan bentuk nodul akar semakin besar. Menurut Arimurti (2000), kemampuan *Rhizobium* sp. dalam menambat Nitrogen dari udara dipengaruhi oleh besarnya bintil akar dan jumlah bintil akar. Semakin besar atau semakin banyak nodul akar yang terbentuk, semakin besar Nitrogen yang ditambat. Semakin aktif nitrogenase semakin banyak pasokan Nitrogen bagi tanaman, sehingga dapat memperbaiki pertumbuhan tanaman.

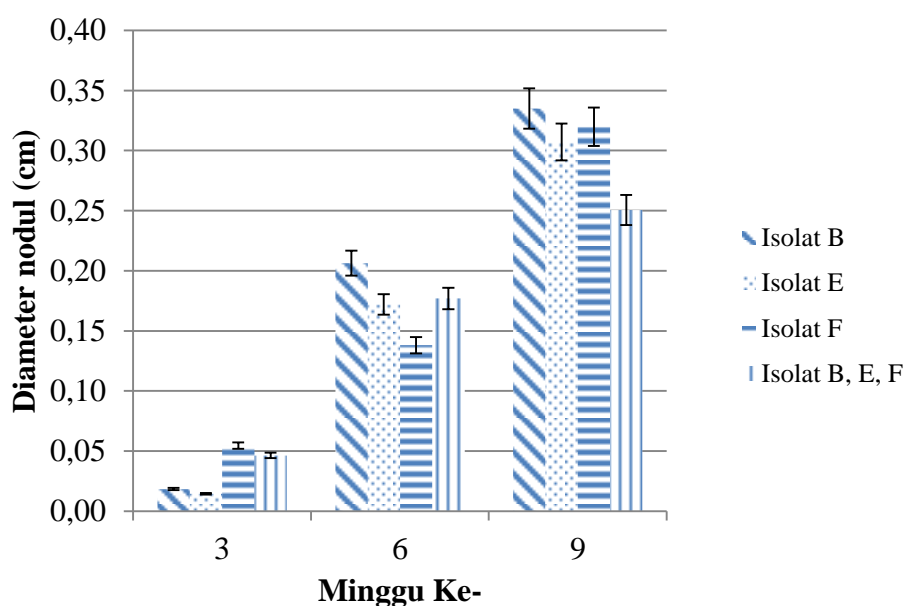
Hasil sidik ragam parameter diameter nodul menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata (lampiran 7.g). Rerata bobot nodul pada setiap perlakuan pada minggu ke-9 disajikan pada tabel 5. Nilai masing-masing perlakuan yaitu perlakuan inokulum isolat B (0,33 cm), perlakuan inokulum isolat E (0,31 cm), perlakuan inokulum isolat F (0,32 cm) dan perlakuan inokulum isolat campuran (0,25 cm).

Kemampuan *Rhizobium* sp. dalam berasosiasi dengan tanaman kedelai

Edamame dapat dilihat dari ukuran nodul akar. Semakin besar ukuran nodul akar maka semakin besar juga Nitrogen yang ditambat. Apabila *Rhizobium* sp. kompatibel dengan kedelai Edamame maka sel bakteri akan memasuki rambut akar tanaman dan akan berkembang, jaringan akar akan terdesak sehingga muncul benjolan artinya semakin pesat perkembangan *Rhizobium* sp. dalam nodul maka juga semakin besar pula nodul yang terbentuk (Lisna, 2008). Pada tabel 6 rerata diameter nodul berkisar antara 0,25 – 0,33 cm. Sedangkan pada karakterisasi nodul awal sebelum re-inokulasi (tabel 1) menunjukkan rerata diameter nodul sebesar 0,38 cm. Hal ini menandakan bahwa rerata diameter nodul hasil re-inokulasi lebih kecil dibandingkan diameter nodul awal sebelum dilakukan re-inokulasi. Pada minggu ke-9, pemberian inokulum campuran berpengaruh sama dengan inokulum dari isolat B, isolat E dan isolat F dalam hal diameter nodul. Hal ini diduga karena inokulan isolat tunggal dan campuran mampu berasosiasi dengan tanaman kedelai Edamame sehingga mampu meningkatkan ukuran diameter nodul. Rerata diameter nodul kedelai Edamame berkisar antara 0,25-0,34 cm. Perkembangan diameter nodul selama 9 minggu tersaji pada gambar 13.

Berdasarkan gambar 13 dapat diketahui bahwa bahwa diameter nodul pada semua perlakuan mengalami peningkatan dari minggu ke-3 sampai minggu ke-9. Pada minggu ke-3 sudah mulai terjadi pembentukan nodul pada akar Edamame sehingga berpengaruh terhadap rerata nodul pada setiap perlakuan. Nilai rerata diameter nodul pada minggu ke-3 berkisar 0,01 – 0,05 cm. Menurut Adisarwanto (2005) mengungkapkan bahwa nodul atau bintil akar tanaman kedelai terbentuk pada umur 4 - 5 hst yaitu sejak terbentuknya akar tanaman dan dapat mengikat nitrogen dari udara pada umur 10 - 12 HST. Selain itu pada minggu ke-3 umur Edamame masih pada fase vegetatif. Tanaman kedelai yang masih pada masa vegetatif tidak mempunyai atau sedikit mempunyai bintil akar sehingga rerata yang dihasilkan masih sedikit. Pada minggu ke-6 terjadi kenaikan rerata diameter nodul pada setiap perlakuan inokulum yang diberikan. Kenaikan yang terjadi pada minggu ke-6 diduga karena kedelai Edamame sudah mulai memasuki fase generatif tanaman. Fase generatif ini dapat dilihat dari terbentuknya bunga dan mulai terbentuknya polong pada tanaman. Tanaman Edamame saat memasuki masa generatif akan mulai membentuk banyak bintil akar. Nilai rerata diameter

nodul pada minggu ke-6 berkisar 0,14 – 0,21 cm. Pada minggu ke-9 diameter nodul akar juga mengalami kenaikan yang signifikan. Hal ini diduga dikarenakan pada minggu ke-9 merupakan fase puncak perkembangan nodul sehingga terjadi kenaikan rerata diameter. Nilai rerata diameter nodul pada minggu ke-6 berkisar 0,14 – 0,21 cm. Rerata tertinggi terdapat pada tanaman dengan inokulum isolat B (0,34 cm), disusul inokulum isolat F (0,32 cm), inokulum isolat E (0,31 cm) dan inokulum isolat campuran (0,14 cm).



Gambar 13. Diameter nodul Edamame

Berdasarkan hasil analisis nodulasi tanaman kedelai Edamame dan dinamika populasi menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak beda nyata terhadap jumlah nodul, persentase efektifitas nodul, bobot segar nodul, diameter nodul dan dinamika bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol. Hal tersebut berarti inokulum *Rhizobium* sp. kompatibel terhadap pertumbuhan tanaman kedelai Edamame.