

1 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lingkungan Tanah

Lingkungan tanah merupakan lingkungan yang terdiri dari gabungan lingkungan abiotik dan biotik. Gabungan dari kedua lingkungan ini menghasilkan suatu wilayah yang dapat dijadikan sebagai tempat tinggal bagi beberapa jenis makhluk hidup, salah satunya adalah organisme tanah. Tanah dapat didefinisikan sebagai medium alami untuk pertumbuhan tanaman yang tersusun atas mineral, bahan organik dan organisme hidup. Kegiatan biologis seperti pertumbuhan akar dan metabolisme mikroba dalam tanah berperan dalam membentuk tekstur dan kesuburannya (Rao, 1994).

Kehidupan fauna tanah sangat tergantung pada habitatnya, karena keberadaan dan kepadatan populasi suatu jenis fauna tanah di suatu daerah sangat ditentukan oleh keadaan daerah tersebut. Dengan kata lain keberadaan dan kepadatan populasi suatu jenis fauna tanah di suatu daerah sangat tergantung dari faktor lingkungan, yaitu lingkungan abiotik dan lingkungan biotik. Manfaat mikroorganisme yang hidup di dalam tanah salah satunya adalah perubahan bahan organik menjadi zat yang akan menyediakan unsur hara bagi pohon-pohon dan tumbuhan yang berada pada wilayahnya. Tanpa aktivitas mikroorganisme maka segala kehidupan di bumi ini lambat laun akan terhambat. Mikroorganisme yang berperan dalam merubah bahan organik menjadi zat itu adalah bakteri, cendawan, algae, protozoa, dan virus (Sumarsih, 2003). Faktor-faktor lain yang mempunyai pengaruh terhadap keanekaragaman relatif populasi mikroorganisme adalah reaksi yang berlangsung di dalam tanah. Menurut Soepardi (1983) dibandingkan dengan area yang masih utuh, lahan yang diusahakan umumnya mempunyai jumlah dan biomassa fauna tanah lebih sedikit, sedangkan penggunaan lahan dengan praktek pengolahan lahan seperti pengolahan konservasi, penggunaan jerami, tanaman penutup dan penggunaan pupuk organik dapat meningkatkan keragaman fauna tanah.

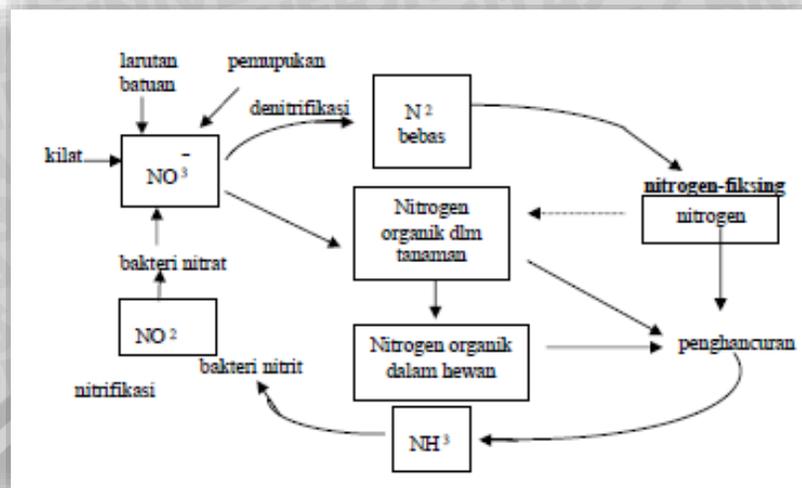
Perbedaan dalam penggunaan lahan akan mempengaruhi populasi dan komposisi fauna tanah. Akan terjadi penurunan secara nyata terhadap biodiversitas

makrofauna tanah jika pengolahan tanah dilakukan secara intensif, pemupukan, dan penanaman secara monokultur pada sistem pertanian konvensional (Crossley *et al.* 1992).

Bakteri yang hidup bebas dan mempunyai kemampuan menambat nitrogen dari udara banyak ditemukan hampir di tiap semua jenis tanah. Bakteri ini biasanya berasosiasi dengan tanaman, sistem perairan, dan sedimen (Knowles, 1982). Berdasarkan penelitian Paramitha (2011) didapatkan populasi *Azotobacter* pada perakaran tebu transgenik IPB 1 menunjukkan jumlah populasi tertinggi pada perakaran IPB1-51 sebesar $87,8 \times 10^4$ Cfu/g tanah. Sedangkan pada perakaran tebu transgenik IPB1-1 tidak ditemukan bakteri *Azotobacter*. Berdasarkan penelitian Agustian *et al.* (2012) didapatkan bahwa populasi bakteri penambat N pada rhizosfir *Thitonia* kriteria B ($19,7 \times 10^3$ Cfu/ g tanah) lebih tinggi daripada kriteria A (15×10^3 Cfu/ g tanah). Ciri kimia tanah seperti pH yang tidak berbeda antara rhizosfir yang diteliti tidak berpengaruh terhadap keberadaan bakteri penambat N.

2.2 Siklus Nitrogen di Dalam Tanah

Berbagai bentuk nitrogen (N) dijumpai di lingkungan kita. Perubahan berkesinambungan berbagai bentuk nitrogen oleh proses fisika dan biologi merupakan daur nitrogen. Daur nitrogen adalah transfer nitrogen dari atmosfer ke dalam tanah. Selain air hujan yang membawa nitrogen, penambahan nitrogen ke dalam tanah terjadi melalui proses fiksasi nitrogen. Fiksasi nitrogen secara biologis dapat dilakukan oleh bakteri *Rhizobium* yang bersimbiosis dengan tanaman legume, bakteri non simbiosis contohnya *Azotobacter*. Nitrat yang dihasilkan oleh fiksasi biologis digunakan oleh produsen (tumbuhan) diubah menjadi molekul protein. Selanjutnya jika hewan atau tumbuhan mati, mahluk pengurai merombaknya menjadi gas amoniak (NH_3) dan ammonium yang yang larut dalam air (NH_4^+). Proses ini disebut dengan amonifikasi. Bakteri nitrosomonas mengubah amoniak dan senyawa ammonium menjadi nitrat oleh nitrobacter. Apabila oksigen dalam tanah terbatas, nitrat dengan cepat ditransformasikan menjadi gas nitrogen atau oksida nitrogen (Gambar 1).



Gambar 1. Siklus Nitrogen (Arief, 1976)

Nitrogen memasuki tanah melalui tanaman yang membusuk, kotoran hewan, dan kilat. Ketika nitrogen memasuki tanah dalam bentuk organik tidak dapat langsung digunakan oleh tanaman. Bakteri yang ditemukan di dalam tanah dapat mengkonversi nitrogen organik menjadi nitrat (nitrogen yang mengandung senyawa yang dicampur dengan oksigen) yang dapat digunakan tanaman. Zat-zat organik di dalam tanaman membuat zat-zat seperti enzim, protein, dan klorofil. Ketika hewan memakan tanaman mereka menghilangkan nitrogen dalam kotoran mereka di mana ia kembali menjadi tanah dalam bentuk organik. Saat tanaman itu mati dan membusuk mereka juga mengembalikan nitrogen kembali ke tanah dalam bentuk organik.

Sekitar 75% nitrogen (N) terdapat di atmosfer bumi, kehadiran N dalam tanah hampir seluruhnya merupakan hasil kerja biologi dan juga pemupukan secara alami. Nitrogen yang terdapat di atmosfer tersebut tidak dapat digunakan langsung oleh organisme. Sumber nitrogen paling umum dan sering dipakai oleh organisme adalah ion-ion nitrat (NO_3^-) yang diserap oleh tumbuhan dan diubahnya menjadi gugusan amino (NH_2) serta bahan hidup lainnya yang mengandung nitrogen (Arief, 1989).

Nitrogen yang masuk dalam tubuh tanaman akan menetap sampai tanaman itu mati. Hewan sebagai organisme harus mendapatkan nitrogen tersebut dengan cara memakan tanaman atau hewan lainnya, dan hewan tersebut akan mati. Melalui

pembusukan, semua nitrogen organik dari tanaman dan hewan yang mati itu pada akhirnya diubah menjadi amoniak (NH_3). Zat amoniak sangat berguna bagi bakteri nitrifikasi untuk pembuatan makanannya. Bakteri ini ada dua macam, pertama, menyerap amoniak dan mengubahnya menjadi ion-ion nitrat (NO_3^-) yang kemudian dilepaskan ke dalam lingkungan. Kedua, menyerap nitrit dan mengubahnya menjadi ion-ion nitrat (NO_3^-) yang juga pada akhirnya dilepaskan ke dalam lingkungan (Salisbury dan Ross, 1995).

Keberadaan nitrat di lingkungan dipengaruhi oleh bakteri denitrifikasi, yang dalam kegiatan metabolismenya mengubah nitrat dan menghasilkan antara lain, molekul nitrogen yang bebas (N_2). Dengan demikian bakteri tersebut berperan mengurangi nitrat di lingkungannya dan menambah jumlah nitrogen bebas di udara. Tetapi pengurangan persediaan nitrat di lingkungan dapat diimbangi dengan adanya organisme yang mengikat nitrogen (*fixing nitrogen*), yaitu organisme yang langsung menangkap nitrogen dari udara seperti beberapa bakteri dan ganggang biru yang hidup di air dan tanah gembur yang kegiatannya menangkap nitrogen udara dan diubahnya menjadi asam amino dan protein. Jika organisme ini mati, maka nitrogen organik dalam tubuhnya akan melepaskan amoniak ke dalam tanah yang selanjutnya zat amoniak itu diubah kembali menjadi nitrat oleh bakteri nitrifikasi (Deacon, 2002). Dengan adanya bakteri nitrogen fiksing, berarti siklus nitrogen secara keseluruhan telah lengkap. Jadi siklus nitrogen ditentukan oleh empat macam bakteri yang berbeda yaitu : bakteri pembusuk, bakteri nitrifikasi, bakteri denitrifikasi dan bakteri fiksing (penambat N).

Pengikatan N_2 di udara menjadi ammonium dibantu oleh enzim nitrogenase. Banyaknya N_2 yang diikat tergantung dari kondisi biologi, fisika, dan kimia tanah. Salah satu yang terpenting adalah ketersediaan C-organik sebagai sumber energi mikroorganisme. Maka dari itu kemampuan penambatan N_2 bervariasi pada tiap tempat. Mekanisme penambatan Nitrogen secara biologis dapat digambarkan dengan persamaan berikut ini (Oelze, 2000)



Nitrogenase adalah dua protein kompleks, satu komponen, dinamakan nitrogenase reduktase (NR) adalah besi protein yang menerima elektron dari ferredoxin dan kemudian mengirimkannya ke komponen lainnya dinamakan nitrogenase atau MoFe protein. Nitrogenase pertama kali menerima elektron dari NR dan proton dari larutan. Nitrogenase mengikat molekul dari molekul nitrogen (melepaskan H_2 pada waktu yang sama), dan kemudian menerima elektron dan proton dari NR, menambahkannya ke dalam molekul N_2 , akhirnya melepaskan dua molekul amoniak NH_3 . Melepaskan molekul hidrogen (H_2) rupanya adalah bagian yang hakiki dari fiksasi nitrogen. Cukup banyak sistem fiksasi nitrogen berisi enzim, hydrogenase, yang memanen elektron dari molekul hidrogen dan mentransfernya kembali ke dalam ferredoxin, kemudian menyimpan beberapa energi metabolik yang hilang selama reduksi nitrogen.

Simbiosis mutualisme yang terjadi bakteri mendapatkan zat hara yang kaya energi dari tanaman inang sedangkan tanaman inang mendapatkan senyawa nitrogen dari bakteri untuk kehidupannya. Untuk menambat nitrogen bakteri ini menggunakan enzim nitrogenase, dimana enzim ini akan menghambat gas nitrogen di udara dan merubahnya menjadi gas amoniak. Gen yang mengatur proses penambatan ini adalah gen Nif (nitrogen-fixation). Gen-gen Nif ini berbentuk suatu rantai tidak terpencair ke dalam sejumlah DNA yang sangat besar yang menyusun kromosom bakteri, tetapi semuanya terkelompok dalam suatu daerah.

2.3 Mikroba Penambat N pada Tanah

Peranan mikroba dalam kesuburan tanah ditunjukkan dengan aktivitasnya dalam memperbaiki struktur tanah. Dalam kaitannya dengan peningkatan ketersediaan hara, mikroba berfungsi untuk mempercepat dekomposisi bahan organik dan sebagai pemacu tingkat kelarutan senyawa anorganik yang tidak tersedia menjadi bentuk tersedia. Kesuburan tanah tidak hanya bergantung pada komposisi kimiawinya melainkan juga pada ciri alami mikroba yang menghuninya. Mikroba yang menghuni tanah dapat dikelompokkan menjadi bakteri, *actinomycetes*, jamur, alga dan protozoa.

Bakteri merupakan kelompok mikroba dalam tanah yang paling dominan dan mungkin meliputi separuh dari biomassa mikroba dalam tanah. Bakteri terdapat

dalam segala macam tipe tanah tetapi populasinya menurun dengan bertambahnya kedalaman tanah (Rao, 1994). Tidak mudah untuk menentukan populasi total bakteri secara tepat pada suatu tanah. Jumlahnya beragam tergantung tekstur, kandungan air dan banyak parameter lainnya terutama ketersediaan substrat organik dalam tanah. Bakteri dapat menahan kondisi iklim yang ekstrim walaupun temperatur dan kelembapan mempengaruhi populasinya. (Rao, 1994).

Salah satu parameter yang menentukan produktivitas tanah adalah mikroba tanah (Sutedjo *et al.* 1991). Tanah yang berada dalam kondisi normal mengandung berbagai jenis mikroba. Perubahan keanekaragaman mikroba berhubungan dengan kualitas tanah dan pengembangan agroekosistem yang berkelanjutan (Kennedy dan Gewin, 1977). Sejumlah mikroorganisme tanah sanggup menggunakan secara langsung nitrogen atmosfer sebagai sumber nitrogen bagi kehidupannya. Kelompok mikroorganisme ini ada dua menurut cara penambatan nitrogen yang dilakukan yaitu: (1) penambatan nitrogen non simbiosis yaitu mikroorganisme yang sanggup mengubah molekul nitrogen menjadi ammonium tanpa bergantung pada organisme lain; (2) penambat nitrogen simbiosis yaitu mikroorganisme yang menambat nitrogen melalui hidup bersama dalam akar leguminosa dan tumbuhan lain. Bakteri penambat nitrogen simbiotik meliputi: (a) *Rhizobium* - hidup dalam bintil akar leguminosae dan (b) *Anabaena azollae*, sedangkan bakteri penambat non simbiotik meliputi: (a) *Azotobacter* hidup di rhizosfer tanaman di lahan kering, (b) *Clostridium* hidup di tanah tergenang/ tanah sawah, (c) *Azospirillum*, hidup di permukaan / dalam akar, (d) *Cyanobacteria*, hidup di tanah tergenang/tanah sawah. Morfologi setiap koloni bakteri penambat nitrogen berbeda-beda pada setiap media pertumbuhan (Gambar 2).



Gambar 2. Morfologi Koloni Bakteri Penambat N pada Media yang Berbeda (Hamdi, 1982)

Bakteri yang hidup bebas dan memiliki kemampuan untuk memfiksasi nitrogen molekuler dapat dibedakan menjadi organisme aerob obligat, aerob fakultatif, dan anaerob. Bakteri aerob obligat termasuk dalam genus-genus *Azotobacter*, *Arthrobacter* dan *Bacillus*. Bakteri anaerob fakultatif antara lain termasuk dalam genus-genus *Aerobacter*, *Klebsiella*, dan *Pseudomonas*. Bakteri pemfiksasi nitrogen yang anaerob diwakili oleh genus-genus *Clostridium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, dan *Methanobacterium*. Pada beberapa dari genus-genus ini, fiksasi nitrogen terjadi secara fotoautotrof yang ditunjukkan oleh adanya pigmen fotosintetik dalam selnya seperti misalnya pada genus *Rhodospseudomonas* yang cukup dikenal (Rao, 1994).

Azotobacter merupakan bakteri penambat nitrogen yang mampu menghasilkan substansi zat pemacu tumbuh giberelin, sitokinin, dan asam indolasetat, sehingga pemanfaatannya dapat memacu pertumbuhan akar (Alexander, 1992). Bakteri ini seringkali berlokasi dalam akar di bawah tanah atau berada pada buku batang dan pembuluh jaringan yang kompak seperti buku batang dan pembuluh xylem, sehingga bakteri ini mampu tumbuh pada lingkungan dengan tekanan O_2 yang rendah. Fiksasi nitrogen dilakukan oleh bakteri, bakteri ini menyelenggarakan

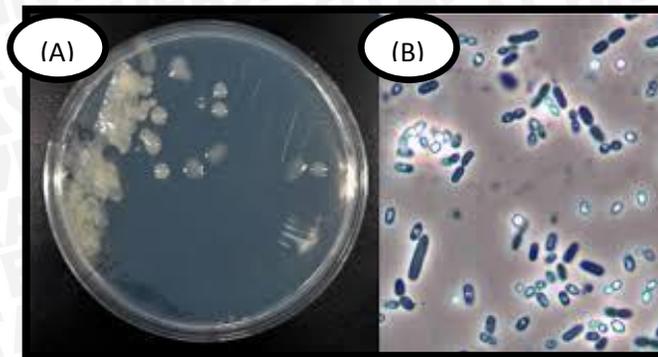
fiksasi nitrogen yang terjadi baik oleh bakteri yang hidup bebas atau hidup bersimbiosis dalam akar tanaman legum. Fiksasi nitrogen ini melibatkan penggunaan ATP dan proses reduksi ekuivalen berasal dari metabolisme primer. Semua reaksi yang terjadi dikatalisis oleh nitrogenase.

2.4 Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik

2.4.1 *Azotobacter sp.*

Bakteri penambat nitrogen non simbiotik, termasuk dalam famili *Azotobacteriaceae* yang terdiri dari empat genus. Pertama, genus *Azotobacter* (Gambar 3) terdiri dari empat spesies, yaitu *A. crhooococcum*, *A. beijerinkii*, *A. vinelandii* dan *A. paspali* (Hamdi, 1982).

Genus *Azotobacter* dicirikan dengan sel berbentuk batang, gram negatif, bersifat aerobik obligat dan mempunyai ukuran sel yang lebih panjang dari prokariot lainnya dengan diameter sel 2-4 μm atau lebih. Beberapa strain motil dengan flagel peritrikha. Salah satu inokulan bakteri yang penting untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen tanah, dan peningkatan hasil adalah *Azotobacter*. Kemampuan *Azotobacter* dalam memfiksasi N_2 telah diketahui pertama kali oleh Beijerinck pada tahun 1901. Namun demikian peningkatan hasil ini tidak konsisten jika dibandingkan dengan rendahnya kapasitas fiksasi bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik. Karena itu, diduga terdapat faktor lain yang berperan dalam pengendalian pertumbuhan tanaman seperti produksi fitohormon, pemutusan siklus penyakit maupun hama melalui perubahan karakteristik mikroba, fisik atau kimia tanah, atau melalui peningkatan aktivitas makrofauna tanah seperti cacing tanah.



Gambar 3. (A) Bentuk Koloni Bakteri *Azotobacter sp* (B) Kenampakan mikroskopis bakteri *Azotobacter sp* (Hamdi, 1982)

Fungsi *Azotobacter* untuk pertanian dan perkebunan menghasilkan hormon pertumbuhan dan mengurangi serangan hama. Bakteri dari famili *Azotobacteraceae* merupakan sebagian besar dari bakteri pemfiksasi nitrogen yang hidup bebas. *Azotobacter* yang diinokulasi dari tanah efektif meningkatkan hasil tanaman budidaya pada tanah yang dipupuk dengan kandungan bahan organik yang cukup. *Azotobacter* juga diketahui mampu mensintesis substansi yang secara biologis aktif seperti vitamin-vitamin B, asam indol asetat, dan giberelin. Bakteri ini memiliki sifat dapat menghambat pertumbuhan jamur (fungistatik) bahkan jamur tertentu yang sangat patogen seperti *Alternaria* dan *Fusarium*. Sifat *Azotobacter* dapat menjelaskan pengaruh menguntungkan yang dapat diamati pada bakteri ini dalam meningkatkan tingkat perkecambahan biji, pertumbuhan tanaman, tegakan tanaman, dan pertumbuhan vegetatif.

Beberapa eksperimen yang dilaksanakan di daerah beriklim sedang di dunia menunjukkan bahwa fiksasi nitrogen pada tanah yang diinokulasi dengan *Azotobacter* tidak akan lebih dari 10 sampai 15 kg N/ha/tahun, tergantung tersedianya sumber karbon. Bakteri ini juga memiliki potensi mengekskresikan berbagai senyawa eksopolisakarida (EPS) dan asam lemak (Suryatna *et al.* 2006). Eksopolisakarida dapat berfungsi sebagai biosurfaktan yang dapat meningkatkan biodegradasi limbah minyak bumi (Iwabuchi *et al.* 2002). Sedangkan Vater *et al.* (2002) menyatakan bahwa asam lemak berfungsi sebagai biosurfaktan karena merupakan senyawa amfifatik yang memiliki gugus liofobik dan liofilik. Sel *Azotobacter* berukuran besar

dengan bentuk batang, banyak isolat hampir seukuran khamir dengan diameter 2-4 μm atau lebih.

Pada media yang mengandung karbohidrat, kapsul tambahan atau lapisan lendir diproduksi oleh bakteri pengikat nitrogen yang hidup bebas ini. Meskipun *Azotobacter* adalah bakteri aerob obligat, enzim nitrogenase yang dimilikinya yaitu enzim yang mengkatalisis pengikatan N_2 bersifat sensitif terhadap O_2 . Sehingga diduga bahwa karakteristik *Azotobacter* yang mempunyai kapsul lendir yang tebal membantu melindungi enzim nitrogenase dari O_2 . Metabolisme senyawa karbon teroksidasi sempurna, sedangkan asam atau produk fermentasi yang lain jarang dihasilkan. *Azotobacter* dapat membentuk struktur sel istirahat yang disebut kista. Seperti halnya bakteri berendospora, kista *Azotobacter* resisten terhadap proses pengeringan, penghancuran mekanik, ultraviolet, dan radiasi. Namun, tidak seperti endospora, kista *Azotobacter* tidak resisten terhadap panas dan tidak mengalami dormansi secara lengkap (Madigan *et al.* 2000).

Pertumbuhan *Azotobacter* dalam media semi padat dapat dilihat setelah masa inkubasi selama 2 sampai 7 hari, yang dicirikan dengan pembentukan pelikel berwarna putih, ringan, tidak tembus cahaya, bentuk irregular dan mengelilingi media sehingga terlihat seperti cincin dengan diameter 2-5 mm. koloni *Azotobacter* pada media padat terlihat berwarna putih berlendir dan mucoid. Sedangkan bentuk sel dicirikan dengan bentuk batang ujung tumpul, berpasangan atau berbentuk rantai.

Beberapa spesies dari genus *Azotobacter*, antara lain *Azotobacter chroococcum* mempunyai flagel peritrikha, lendir sedang, dan memiliki pigmen hitam-coklat yang tidak larut. *A. venelandii*, *A. paspali* dan *A. agilis* memiliki flagel peritrikha, lendir sedikit sampai sedang, berwarna hijau, pigmen fluoresens dan larut. *A. beijerenkii* tanpa flagel, lendir sedang dan pigmen kuning muda kecoklatan tidak larut. *A. macrocytogenes* berflagel polar, lendir banyak dan pigmen merah muda yang dapat larut (Rao, 1994).

Bakteri dari famili *Azotobacteraceae* merupakan sebagian besar dari bakteri pemfiksasi nitrogen heterotrof yang hidup bebas. Spesies *A. chroococcum*, terutama dijumpai pada tanah-tanah yang netral, sedangkan *A. gilis* merupakan spesies akuatik.

A. vinelandii dan *A. beijerinckii* semula dipisahkan dari tanah - tanah di Amerika Utara. *A. insignis*, berasal dari sampel tanah Indonesia. *A. macrocytogen* dipisahkan dari tanah-tanah Denmark dan *A. paspali* dari rizosfer tumbuhan *Paspalu sp* yang berasal dari tanah-tanah Brazil (Rao, 1994).

Kemampuan bakteri penambat N non simbiotik untuk mengikat nitrogen tanpa kehadiran inang dan kemampuannya untuk hidup pada kondisi masam membuat kelompok bakteri ini memiliki tingkat toleransi tinggi terhadap lingkungannya. Genus *Azotobacter* tumbuh dengan baik pada kondisi juga pada berbagai jenis media seperti karbohidrat, alkohol dan asam organik.

Azotobacter bersifat aerob obligat, namun enzim nitrogenasenya sangat sensitif terhadap O₂ sama seperti nitrogenase lainnya, oleh karena itu *Azotobacter* melakukan respirasi tinggi untuk melindungi nitrogenase dari O₂ sehingga konsentrasi O₂ intraseluler pada *Azotobacter* relatif lebih sedikit (Brock dan Madigan, 1994).

Lebih lanjut Brock dan Madigan (1994), menyatakan bahwa *Azotobacter chroococum* mampu tumbuh dan mereduksi N₂ tanpa kehadiran molybdenum yang berfungsi dalam pembentukan nitrogenase. Jika bakteri ini ditempatkan pada media yang kekurangan amonia dan molybdenum tetapi mengandung logam vanadium, maka bakteri ini akan menghasilkan vanadium nitrogenase menggantikan posisi molibdenum yang berfungsi menstimulasi pengikatan nitrogen. Seperti pada enzim molibdenum, vanadium nitrogenase juga terdiri dari dua protein, pertama protein yang mengandung besi, kedua protein yang mengandung besi dan vanadium yang dapat mereduksi N₂ menjadi NH₃, H⁺ menjadi H₂ dan H₂C₂ menjadi C₂H₄.

Suhu optimum bagi pertumbuhan *Azotobacter chroococum* adalah 30°C, jumlahnya dapat mencapai beberapa ratus per gram tanah. Walaupun penyebaran populasi bakteri ini tidak begitu luas, namun spesies ini merupakan contributor penting bagi penambatan nitrogen. *A. beijerinckii* lebih dominan pada tanah masam, dengan pH di bawah 3,0. Penyebaran spesies ini cukup luas, banyak ditemukan di tanah tropik bahkan juga ditemukan pada daerah antartik. Demikian pula *Derxia*

gummosa yang banyak ditemukan di wilayah tropis Amerika Utara, mampu tumbuh dengan baik pada pH 4,5 - 6,5 (Tate, 2000).

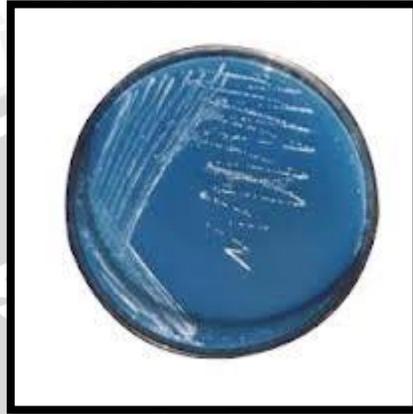
2.4.2 *Azospirillum sp.*

Azospirillum adalah bakteri penambat nitrogen yang biasa ditemukan di dalam tanah dan dapat hidup secara bebas atau berasosiasi dengan berbagai akar tanaman, terutama jenis rumput - rumputan dan serealia (Bashan, 1997). *Azospirillum* tidak hanya dapat menambat N dari atmosfer (Dobereiner and Day, 1976), juga mampu menghasilkan hormon tumbuh tanaman seperti IAA (*Indole Acetic Acid*), GA (*Gibberellic Acid*), dan kinetin. Oleh karena kemampuan tersebut, *Azospirillum* dimanfaatkan sebagai *biofertilizer* (Ribaud, 2006). Fungsi *Azospirillum* untuk pertanian dan perkebunan adalah untuk menambah jumlah percabangan akar. Bakteri ini memiliki kemampuan menambat N_2 dan menghasilkan fitohormon. Fitohormon adalah hormon tumbuhan yang berupa senyawa organik yang dibuat pada suatu bagian tanaman dan kemudian diangkut ke bagian lain, yang dengan konsentrasi rendah menyebabkan suatu dampak fisiologis. Fitohormon yang dihasilkan berupa auksin, giberelin, sitokinin dan etilen. Misalnya bakteri *Azospirillum sp.* diintroduksi ke dalam tanaman mangga maka tanaman tersebut akan mengalami pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan tanaman mangga yang tidak diintroduksi dengan bakteri ini.

Menurut Reis *et al.* (2011), *Azospirillum* adalah bakteri gram negatif. Bakteri ini hidup pada lingkungan dan tanaman yang beraneka ragam tidak hanya tanaman agronomi yang penting, seperti sereal, tebu, rumput, tetapi juga pada tanaman lain seperti kopi, buah-buahan dan bunga-bunga. *Azospirillum* memproduksi fitohormon, terutama auksin. *Azospirillum* diisolasi pada medium sukrosa semi padat. Setelah inkubasi selama 3 – 5 hari akan membentuk pelikel, bentuk dari koloni biasanya bulat dan berwarna putih pada media semi padat (Gambar 4).

Bakteri ini hidup bebas di dalam tanah, baik disekitar maupun dekat dengan perakaran. Potensinya telah diketahui oleh peneliti memiliki banyak manfaat baik dalam tanah maupun pada tanaman, sehingga banyak diaplikasikan sebagai

biofertilizer. Eckert *et al.* (2001) melaporkan bahwa *Azospirillum* digunakan sebagai *biofertilizer* karena mampu menambat nitrogen (N_2) 40-80% dari total nitrogen dalam rotan, dan 30% nitrogen dalam tanaman jagung.



Gambar 4. Bentuk Koloni Bakteri *Azospirillum* sp (Reis, 2011)

Spesies yang keempat adalah *A. halopraeferans*. Spesies ini diisolasi dari rumput kallar (*Leptochloa fusca*), yang tumbuh di daerah salin di Pakistan dan kelihatannya spesifik pada tanaman tersebut, karena upaya untuk mengisolasi *A. halopraeferans* dari tanaman lain yang tumbuh di Brasil tidak berhasil. Berikut, spesies baru berhasil diisolasi dari tanaman padi di Irak. Spesies ini diberi nama *A. irakense*. Walaupun spesies ini belum ada dilaporkan diisolasi dari tanaman lain dan dari negara lain. Berikutnya, pada tahun 1997, ditemukan spesies lain dari *Conglomeromonas largomobilis* sp. *Largomobilis* yang mirip dengan spesies *A. lipoferum* dan *A. brasilense*, tetapi secara nyata cukup berbeda. Spesies ini diberi nama *A. largimobile*.

Kelompok baru dari spesies *Azospirillum* terus ditemukan di seluruh dunia. Pada tahun 2001, di Brasil ditemukan spesies baru oleh ilmuwan Brasil Johanna Dobreiner. Untuk menghargai beliau, spesies ini diberi nama *A. dobereinerae*. Spesies lainnya diisolasi dari tanah pertanaman padi di China pada tahun 1982 dan diberi nama *A. oryzae*. Kemudian, spesies lain ditemukan dari akar dan batang tanaman *Melinis minutiflora*, sehingga diberi nama *A. melinis*. Pada tahun 2007,

dengan menggunakan media semi solid pada pH 7,2 – 7,4, ditemukan dua spesies baru lagi di Kanada, yang diberi nama *A. canadense* dan *A. zae*.

Satu spesies baru berhasil diisolasi dari tanah yang terkontaminasi minyak oleh peneliti Taiwan yang menggunakan nutrisi agar. Spesies tersebut diberi nama *A. rugosum*. Pada tahun 2009, dua spesies baru berhasil ditemukan lagi, yaitu *A. palatum* dan *A. picis*. *A. palatum* diisolasi dari tanah di China dan *A. picis* di Taiwan. Terakhir, spesies baru *A. thiophilum* diisolasi dari Rusia. Walaupun spesies ini memiliki hubungan yang erat dengan spesies *Azospirillum* lainnya, tetapi spesies ini mampu tumbuh sebagai mikсотропik pada kondisi yang mikroaerobik.

Belakangan diketahui bahwa sel-sel *Azospirillum* tidak terpengaruh oleh air perkolasi, tetapi terperap ke dalam partikel tanah. Pada tanah jenuh air tanpa tanaman, *Azospirillum* tetap berada pada daerah inokulasi dan tidak bergerak. Oleh karenanya, masuk akal untuk berasumsi bahwa ada mekanisme penyebaran bakteri lain yang efisien, misalnya kemotaksis (Bashan dan Holguin, 1997).

Fiksasi nitrogen adalah mekanisme pertama yang diusulkan untuk menjelaskan peningkatan pertumbuhan tanaman setelah diinokulasi dengan *Azospirillum*. Ini terutama karena ada peningkatan sejumlah senyawa nitrogen dan aktivitas enzim nitrogenase pada tanaman yang diinokulasi dengan *Azospirillum*. Akan tetapi, beberapa tahun kemudian, penelitian menunjukkan bahwa kontribusi fiksasi N₂ oleh *Azospirillum* terhadap tanaman sedikit sekali, berkisar antara 5 sampai 18% dari total peningkatan tanaman. Secara umum, kontribusinya kurang dari 5%. Penemuan ini membuat orang meninggalkan aspek fiksasi N₂ ini dari *Azospirillum*. Akhir-akhir ini kajian *Azospirillum* pada aspek fiksasi N₂ mulai meningkat. Aktivitas enzim nitrogenase stabil dan menunjukkan aktivitas asetilen reduksi tertinggi pada suhu 42°C. Aktivitas enzim nitrogenase *Azospirillum* ditemukan meningkat ketika ditumbuhkan dalam kultur campuran dengan bakteri lainnya, kendatipun mereka berasal dari habitat yang sangat berbeda. Contoh kasus adalah campuran *A. brasilense* dengan bakteri *Staphylococcus sp.* yang meningkatkan fiksasi N₂ dari *A. brasilense*. Pengaruhnya lebih kuat ketika *Staphylococcus* ditambahkan pada kultur *A.*

brasiliense. Pada kajian lain, fiksasi N₂ dari *A. brasiliense* Sp-245 diperkuat oleh penambahan aglutinin kecambah gandum.

Azospirillum biasanya terakumulasi di permukaan tanah terutama di daerah perakaran tanaman padi dan rerumputan. Bakteri ini tumbuh dengan optimal pada suhu 32° - 40° C. Aktivitas optimum nitrogenase terjadi dalam kondisi Ph antara 6,8 sampai 7,8 (Hamdi, 1982).

2.5 Manfaat Nitrogen bagi Tumbuhan

Nitrogen (N) merupakan nutrisi penting bagi tumbuhan dan diperlukan dalam jumlah besar. Kandungan N dalam jaringan tumbuhan tinggi per berat kering jaringan adalah sebanyak 1,5%. Nitrogen menjadi salah satu komponen dalam molekul protein, purin, pirimidin dan porfirin. Purin dan pirimidin merupakan basa nitrogen yang penting dalam pembentukan molekul asam nukleat (RNA dan DNA). Sedangkan porfirin penting dalam pembentukan klorofil (Arief, 1989). Ketiga kriteria tersebut meliputi (1) unsur N penting bagi pertumbuhan dan reproduksi, (2) unsur tersebut tidak dapat diganti dengan unsur lain dan (3) kebutuhan akan unsur tersebut bersifat langsung.

Defisiensi nitrogen selalu memperlihatkan klorosis pada daun dewasa secara perlahan-lahan, yang kemudian menjadi kuning. Biasanya tidak terjadi nekrosis (jaringan menjadi mati). Klorosis menyebar dari daun dewasa ke daun yang lebih muda (Gardner *et al.* 1991).

Karakteristik gejala defisiensi adalah terbentuknya antosianin pada batang, tulang daun, tangkai daun sehingga berwarna merah atau merah ungu. Daun muda yang mengalami defisiensi nitrogen kadang-kadang lebih kaku, kurang berkembang daun normal, percabangan tertahan karena dormansi tunas lateral yang berkepanjangan. Sementara kelebihan nitrogen sering menyebabkan timbulnya poliferasi batang dan daun, dan buah menjadi berkurang.

2.6 Botani Kopi Robusta

Kopi Robusta (*Coffea canephora Perre ex Froehner*) termasuk kedalam genus *Coffea* dari Rubiceae. Akar kopi memiliki akar tunggang yang tumbuh tegak

lurus ke bawah sedalam 45cm. Perakaran kopi relatif dangkal, lebih 90 persen dari berat total akar terdapat pada lapisan 0-30 cm. Batang dan cabang kopi robusta dapat tumbuh mencapai ketinggian 2-5 meter dari permukaan tanah. Dibandingkan dengan kopi Arabika, daun kopi Robusta lebih besar dan bergelombang serta permukaanya lebih kasar.

1.6.1 Syarat Tumbuh Kopi Robusta

Penanaman kopi Robusta di Indonesia umumnya berada pada ketinggian 0-500 meter di atas permukaan laut. Perakaran kopi relatif dangkal, lebih dari 90% dari berat akar terdapat pada lapisan tanah 0-30 cm. tanaman kopi dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah dan tumbuh baik pada ketinggian 800 sampai dengan 2000 mdpl, suhu 15° sampai dengan 25° C, curah hujan 1.750 sampai dengan 3000 mm per tahun dan pH tanah 5,5 sampai dengan 6,5.

Kopi mengambil hara dari dalam tanah untuk pertumbuhan vegetatif dan juga untuk pertumbuhan buah. Pertumbuhan vegetatif ini sama pentingnya dengan pembuatan buah, karena buah kopi ini hanya terbentuk oleh cabang-cabang lateral yang merupakan produk pertumbuhan. Sedangkan pengambilan hara dari tanaman kopi ini sangat berbeda-beda dan menurut jenis kopi itu sendiri. Kebutuhan hara oleh panen 1 t/ha/th (Tabel 1).

Tabel 1. Kebutuhan pengambilan hara tanaman kopi (Mujiburrahman, 2011)

Jenis Kopi	N (Kg)	P ₂ O ₅ (Kg)	K ₂ O (Kg)
Robusta	35,0	6,0	50,0
Arabika	34,0	5,1	48,0

*) Per panen 1 ton kopi biji per hektar/tahun

1.6.2 Jenis Perlakuan Tanaman Kopi Robusta

1. Tanaman Tahun Ini (TTI)

TTI adalah tanaman kopi yang ditanam pada tahun ini. Pada TTI ini dilakukan penanaman tanaman kopi dan dilakukan pemeliharaan terhadap jalan, saluran air,

teras, gandung, penaungan tetap, dan penaung sementara. Kopi ditanam dengan jarak 2,75 m x 2,75 m. Pemeliharaan tanaman kopi (TTI) antara lain:

1. Penyulaman tanaman.

Tanaman kopi yang mati dan yang pertumbuhannya kurang baik harus segera disulam. Jika terlalu lama penyulamannya maka akan mempengaruhi homogenitas tanaman.

2. Pemeliharaan teras dan gandung

Pemeliharaan teras dilakukan dengan membersihkan teras dan meratakan teras dengan menggunakan cangkul. Sedangkan pemeliharaan gandung dilakukan dengan membuat gandung baru di sisi yang lain. Salah satu kegiatan pemeliharaan yang cukup penting untuk diperhatikan adalah perbaikan teras. Tanaman yang ditanam perlu mendapatkan jumlah air yang cukup dalam mendukung kegiatan pertumbuhan tanaman kopi. Teras yang terjaga dengan baik akan mampu menopang lereng yang ditanami kopi (PTP Nusantara, 2000).

3. Penyiangan gulma.

Penyiangan gulma alang-alang dan *Mikania sp.* Dapat dilakukan secara manual dan kimia. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ernawati et.al (2008) yang menyatakan bahwa “Cara untuk mengendalikan penggerek buah kopi pada tanaman menghasilkan dilakukan dengan penyemprotan dengan agensia hayati, yaitu dengan pemanfaatan jamur *Beauveria bassiana*”.

4. Pemeliharaan tanaman penaung tetap dan sementara.

Pada TTI, tanaman penaung tetap berumur dua tahun maka perlu dilakukan perempesan jika terdapat pohon yang ranting daunnya terlalu lebat.

2. Tanaman Belum Menghasilkan (TBM)

Pemeliharaan yang dilakukan pada Tanaman Belum Menghasilkan (TBM) adalah:

1. Pengendalian gulma manual.

Penyiangan gulma secara manual dilakukan dengan mencabut menggunakan tangan ataupun sabit sampai bersih. Pada TBM I dan TBM II penyiangan dilakukan secara manual dan tidak diperbolehkan secara kimiawi karena tanaman kopinya

masih pendek sehingga daunnya masih rawan terhadap kerusakan oleh bahan kimia. Pada TBM III menyiang manual dilakukan hanya dibawah tajuk dan sisa penyianganya dipakai sebagai mulsa. Diluar tajuk memakai herbisida tapi harus dilakukan dengan sangat hati-hati. Apabila terkena percikan herbisida pada saat menyemprot, dapat menyebabkan tanaman mengalami stagnasi.

2. Pengendalian hama dan penyakit.

Hama yang menyerang tanaman kopi belum menghasilkan ialah kutu putih dan kutu hijau. Pengendalian kutu putih dilakukan secara mekanis menggunakan semprotan air dengan tekanan tinggi.

3. Pemupukan.

Pada saat TBM pemupukan dilakukan enam kali dalam setahun. Pemupukan merupakan kegiatan pemberian nutrisi pada tanaman kopi guna menunjang pertumbuhan tanaman kopi. Jenis pupuk yang digunakan yaitu:

- Pupuk Organik

Pupuk kandang, pupuk kulit buah kopi diberikan lewat tanah.

- Pupuk An Organik

Urea, ZA, TSP, KCL diberikan lewat tanah. Aplikasi pupuk lewat tanah dibenamkan dengan membuat goretan di kanan kiri pohon sedalam 5 cm dan jarak \pm 50 cm dari batang pohon.

1.7 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Mikroba

Bakteri merupakan mikroorganisme yang paling penting dalam tanah yang berhubungan dengan dekomposisi dan siklus hara, selain itu pada tanah – tanah yang mempunyai aerasi yang baik, bakteri sangat dominan, sebaliknya bakteri sendiri terlibat hampir semua proses biologi dan perubahan kimia dalam lingkungannya yang mengandung sedikit atau tanpa O₂. Populasi mikroorganisme didalam tanah bersama dengan berbagai bentuk binatang dan berbagai jenis tanaman tingkat lebih tinggi membentuk suatu sistem kehidupan yang tidak terpisahkan dari bahan mineral dan bahan organik didalam tanah. Populasi mikroorganisme didalam tanah selain bahan

mineral dan bahan organik dipengaruhi oleh keadaan iklim daerah, tanaman yang tumbuh, reaksi yang berlangsung didalam tanah dan kelembapan tanah (Sutedjo dkk, 1996).

Jumlah bakteri yang ada di dalam tanah dipengaruhi oleh berbagai kondisi yang mempengaruhi pertumbuhannya, seperti temperatur, kelembapan, aerasi dan sumber energi. Tetapi secara umum populasi yang tersebar terdapat dihorison permukaan. Mikroorganisme tanah lebih banyak ditemukan pada permukaan tanah karena bahan organik lebih banyak tersedia. Oleh karena itu mikroorganisme lebih banyak berada pada lapisan tanah yang paling atas (Alexander, 1977).

Aktivitas mikroba yang meliputi pertumbuhan dan perkembangan dipengaruhi oleh faktor abiotik dan faktor biotik. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi adalah sebagai berikut:

1. Suhu

Kisaran suhu untuk pertumbuhan bakteri meliputi suhu minimum, suhu optimum, dan suhu maksimum. Suhu minimum adalah suhu terendah bakteri dapat hidup. Suhu optimum adalah suhu terbaik untuk pertumbuhan bakteri. Dan suhu maksimum adalah suhu tertinggi untuk pertumbuhan bakteri. Bakteri umumnya memiliki suhu minimum 15°C, suhu optimum 25-37°C, dan suhu maksimum 45-55°C (Sutedjo dkk, 1991).

2. pH Tanah

pH tanah sangat mempengaruhi aktivitas dan perkembangan jasad-jasad renik tanah. Biasanya aktivitas bakteri akan menurun dengan menurunnya pH tanah (Hasibuan dan Ritongan, 1981). Sewaktu pertumbuhan bakteri seringkali terjadi perubahan pH media. Lazimnya bakteri tumbuh pada pH sekitar 7. Namun ada juga yang tumbuh pada pH 2 dan pH 10. Pada umumnya bakteri tumbuh dengan baik pada pH sekitar 7 meskipun dapat tumbuh pada kisaran pH 5-8 (Lay, 1994).

3. Kandungan Bahan organik

Bahan organik tanah adalah semua jenis senyawa organik yang terdapat di dalam tanah, termasuk seresah, biomassa organisme, bahan organik terlarut di dalam air, dan bahan organik yang stabil atau humus. Bahan organik adalah satu sumber nutrisi bagi mikroba tanah heterotrof karena sifatnya yang memperoleh karbon dari senyawa organik dalam tanah seperti glukosa. Apabila sumber nutrisi bakteri terpenuhi dengan baik maka bakteri tersebut akan tumbuh dan berkembang dengan baik sehingga jumlah populasinya akan meningkat. Hal ini dibuktikan dengan penelitian Sudhakaran (2013) bahwa populasi bakteri dan jamur tanah pada tanah organik dengan kandungan C-organik $8,63 \pm 0,91$ gram/kg lebih banyak dibandingkan pada tanah konvensional dengan kandungan C-organik $6,40 \pm 0,52$ gram/kg.

