

## BAKTERI PENAMBAT NITROGEN SEBAGAI AGEN *BIOFERTILIZER*

Fadilla Sapalina, Eko Noviandi Ginting, dan Fandi Hidayat

**Abstrak** - Bakteri penambat nitrogen merupakan bakteri yang mampu memfiksasi nitrogen bebas menjadi amonium atau nitrat, sehingga dapat diserap oleh tanaman. Penggunaan *biofertilizer* yang mengandung bakteri penambat nitrogen menjadi alternatif pengganti pupuk anorganik yang dapat mendukung tercapainya pertanian berkelanjutan. Pada tulisan ini dibahas secara ringkas tentang siklus nitrogen, mekanisme penambatan nitrogen oleh bakteri simbiosis dan non-simbiosis, metode isolasi bakteri penambat nitrogen, penelitian terkini dan prospek penelitian lanjutan terkait bakteri penambat nitrogen. Umumnya penelitian melaporkan metode isolasi bakteri penambat nitrogen dengan *nutrient-free* medium dan beberapa diantaranya memodifikasi medium dengan menambahkan reagen. Penelitian terkini cenderung dilakukan melalui pendekatan teknik molekuler seperti *Next Generation Sequencing* (NGS) untuk mengetahui mikrobioma di rizosfer. Penerapan teknik molekuler berpotensi untuk mendapatkan *novel strain* yang bersifat *culture-independent* dan tidak hanya terbatas pada tanaman legum saja. Selanjutnya, melalui rekayasa genetika diharapkan terbentuk strain bakteri yang efektif dengan inokulum dosis rendah dan tahan pada berbagai kondisi lingkungan untuk masa yang akan datang. Tulisan ini bertujuan untuk mengkaji secara sederhana tentang bakteri penambat nitrogen sebagai agen *biofertilizer*.

**Kata kunci:** *biofertilizer*, bakteri penambat nitrogen, tanah

### PENDAHULUAN

Nitrogen ( $N_2$ ) merupakan unsur yang penting bagi makhluk hidup, khususnya tanaman. Unsur nitrogen termasuk salah satu komponen penyusun protein dan berperan dalam proses fotosintesis (Leghari et al., 2016). Kandungan nitrogen di atmosfer sangat melimpah yaitu sekitar 78%, tetapi nitrogen tersebut dalam bentuk molekul yang sebagian besar tidak reaktif, sehingga tidak dapat diserap langsung oleh tanaman. Oleh karena itu, perlu transformasi nitrogen di udara menjadi bentuk molekul yang dapat diserap tanaman. Nitrogen hanya dapat diserap oleh tanaman dalam bentuk ion amonium ( $NH_4^+$ ) atau ion nitrat ( $NO_3^-$ ). Gas dinitrogen dari atmosfer diubah menjadi amonia ( $NH_3$ ), kemudian difiksasi di dalam tanah melalui proses fiksasi (Martinez-Dalmau et al., 2021).

Secara umum fiksasi nitrogen terbagi atas tiga cara yaitu secara fisika melalui petir, secara kimiawi pada industri pembuatan pupuk, dan secara biologis. Fiksasi nitrogen secara biologis terjadi dengan

menggunakan bakteri. Kebutuhan akan unsur nitrogen dapat dipenuhi oleh bakteri dari sumber nitrogen dalam berbagai senyawa organik maupun dari  $N_2$  udara. Fiksasi nitrogen secara biologis bergantung pada serangkaian proses oleh bakteri dengan cara mengubah  $N_2$  menjadi bentuk anorganik yang kemudian diserap tanaman. Bakteri tersebut dapat menambat nitrogen udara melalui non-simbiosis (*free-living nitrogen-fixing bacteria*) dan simbiosis (*root-nodulating bacteria*) dengan tanaman (Simanungkalit et al., 2004).

Penambatan nitrogen oleh bakteri memberikan keuntungan bagi tanaman, sehingga pada masa sekarang banyak dimanfaatkan untuk praktek pertanian, karena menjadi alternatif pengganti pupuk anorganik (Bhat et al., 2015; Soumare et al., 2020). Penggunaan bahan kimia pertanian secara terus-menerus dapat memberikan efek jangka panjang, maka untuk mengatasi hal tersebut digunakanlah bakteri. Pemanfaatan bakteri ini bertujuan untuk pertanian berkelanjutan dan tidak menimbulkan ancaman bagi lingkungan. Penggunaan pupuk anorganik secara berlebihan dapat menyebabkan pencemaran tanah, udara, dan air melalui *leaching*, destruksi karakteristik fisika tanah dan akumulasi bahan kimia beracun. Sementara itu, dalam jangka waktu lama dapat menimbulkan masalah lingkungan

---

*Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit*

Fadilla Sapalina (✉)  
Pusat Penelitian Kelapa Sawit  
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan 20158, Indonesia

Email: fadillasapalina@gmail.com

yang parah dan menurunnya keanekaragaman hayati (Saikia & Jain, 2007).

Di sisi lain, kandungan nitrogen yang terlalu sedikit di dalam tanah, dapat menyebabkan tanaman tidak berkembang dan hasil panen menjadi rendah. Tanaman yang kekurangan nitrogen menjadi berwarna kekuningan, tidak tumbuh dengan subur, memiliki bunga dan buah yang lebih kecil. Oleh sebab itu, kebutuhan nitrogen di tanah harus tetap dijaga dan adanya simbiosis dengan bakteri dapat meningkatkan penyerapan unsur nitrogen di tanah (Bhat et al., 2015). Namun demikian, jumlah mikroba yang berasosiasi dengan tanaman masih terbatas. Oleh karena itu, untuk meningkatkan simbiosis tersebut juga diperlukan kombinasi mikroba (multibakteri sebagai inokulan). Hal tersebut dapat diatasi dengan penggunaan *biofertilizer* (pupuk hayati). *Biofertilizer* menjadi salah satu pilihan untuk memperbaiki kesehatan tanah, karena adanya aplikasi biofertilizer yang mengandung konsorsium bakteri penambat nitrogen. Menurut aplikasi bakteri penambat nitrogen pada tanaman dapat meningkatkan potensi pasokan nitrogen, karena nitrogen tetap akan tersedia langsung bagi tanaman. Dengan demikian, perlu pemahaman lebih lanjut untuk mengkaji secara sederhana tentang bakteri penambat nitrogen sebagai agen *biofertilizer*.

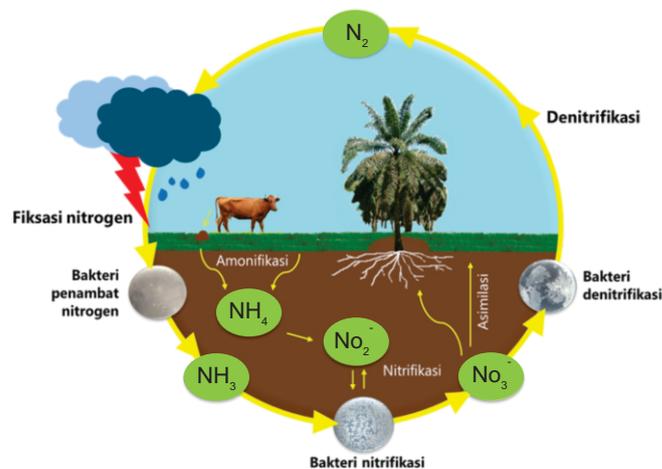
### SIKLUS NITROGEN DI ALAM

Secara umum, di alam terjadi perubahan bentuk nitrogen menjadi senyawa lainnya melalui siklus yang disebut dengan siklus nitrogen (Gambar 1). Proses

yang terjadi selama siklus nitrogen yaitu: (i) proses fiksasi nitrogen menjadi amonium dan nitrat secara fisika melalui petir, secara kimiawi melalui industri pupuk dan biologis oleh bakteri. Proses selanjutnya yaitu (ii) amonifikasi, pembentukan amonium atau dekomposisi (penguraian) organisme yang sudah mati oleh bakteri dan fungi; (iii) nitrifikasi, perubahan amonia menjadi nitrit oleh bakteri *Nitrosomonas* dan nitrat oleh bakteri *Nitrobacter*; (iv) asimilasi nitrogen yang telah tersedia dalam tanah, kemudian diserap oleh akar tanaman; dan (v) denitrifikasi, proses reduksi nitrat menjadi gas nitrogen (Soumare et al., 2020).

Fiksasi nitrogen melalui petir terjadi karena energi listrik yang dihasilkan oleh petir dapat memecah ikatan antar molekul  $N_2$  di atmosfer, selanjutnya bereaksi dengan oksigen ( $O_2$ ) membentuk berbagai molekul stabil seperti oksida nitrat (NO), nitrogen dioksida ( $NO_2$ ). Nitrogen oksida yang terbentuk bereaksi dengan udara di atmosfer untuk membentuk asam nitrat, lalu mencapai permukaan bumi dan menjadi pupuk alami. Kemudian ion nitrat dalam air dapat direduksi oleh zat humat menjadi nitrit,  $N_2$  dan ion  $NH_4^+$ , sehingga dapat diserap oleh tanaman.

Fiksasi nitrogen secara kimiawi pada industri pembuatan pupuk terjadi melalui proses Haber-Bosch dimana proses tersebut akan membentuk amonia ( $NH_3$ ). Menurut Shi et al. (2020) proses Haber-Bosch merupakan proses terbentuknya amonia dari  $H_2$  dan  $N_2$ . Proses Haber-Bosch ini sering dikaitkan dengan masalah lingkungan karena membutuhkan energi secara intensif dan bahan baku yang tidak terbarukan untuk menghasilkan hidrogen (Cherkasov et al., 2015).

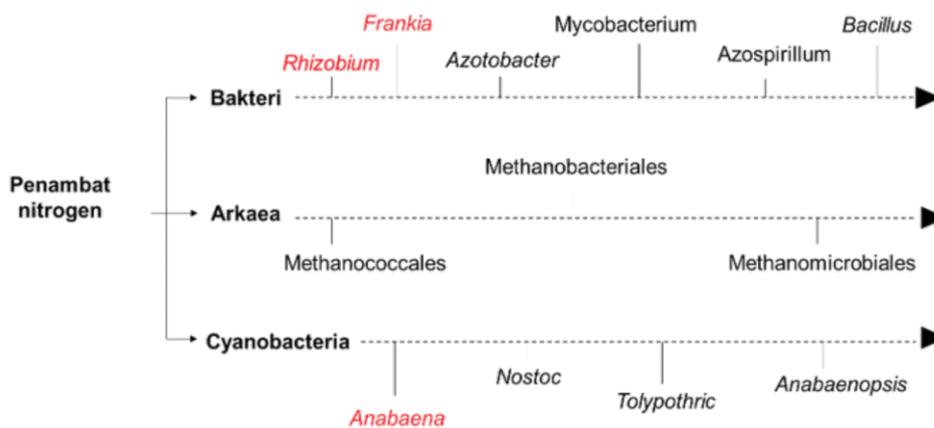


Gambar 1. Siklus nitrogen di alam

## BAKTERI PENAMBAT NITROGEN

Di dalam tanah, nitrogen selalu ditemukan dalam dua bentuk utama yaitu bentuk anorganik sebagai nitrogen mineral (2%) dan organik (98%). Bentuk anorganik meliputi amonia ( $\text{NH}_3$ ), amonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), sedangkan bentuk organik terdapat pada bahan organik hidup seperti biota tanah, hewan, dan sisa-sisa tanaman (Mahmud et al., 2020). Nitrogen organik tidak tersedia secara langsung untuk tanaman dan harus dikonversi menjadi amonium atau nitrat dengan bantuan bakteri penambat nitrogen. Bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas tidak melakukan interaksi langsung dengan organisme lain, seperti *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella* dan lainnya. Bakteri penambat nitrogen *Azospirillum* dapat membentuk asosiasi yang erat dengan beberapa famili *Poaceae* (rumput) yaitu beras, gandum, jagung, oat, dan *barley* (Wagner, 2011). Sementara itu, bakteri penambat nitrogen yang bersimbiosis membentuk nodul atau bintil akar di dalam jaringan akar tanaman, seperti *Rhizobium*, *Frankia*, dan *Anabaena*.

Bakteri pemfiksasi nitrogen yang bersimbiosis mendapatkan nutrisi melalui eksudat akar yang dihasilkan tanaman. Eksudat akar tersebut diketahui sebagai campuran dari senyawa gula kompleks, seperti glukosa, asam amino, asam organik, asam lemak, dan lainnya (Pinton et al., 2007). Eksudat akar di rizosfer dapat mempengaruhi komunitas mikroba tanah, ketersediaan unsur hara makro dan mikro, terutama nitrogen dan fosfor. Eksudat yang sering diamati misalnya, dikarboksilat dalam akar tomat untuk strain biokontrol *Pseudomonas* dan tanaman kacang polong mengeluarkan homoserin untuk *Rhizobium leguminosarum* (Mahmud et al., 2020), sedangkan pada bakteri non-simbiosis menggunakan karbon dan sumber energi yang berasal dari lingkungan. Selanjutnya, tanaman memperoleh nitrogen dari bakteri untuk proses metabolisme. Berikut diagram yang menyajikan kelompok bakteri dengan kemampuan sebagai penambat nitrogen:



Gambar 2. Bakteri penambat nitrogen yang bersimbiosis (genera yang berwarna merah) dan non-simbiosis (genera yang berwarna hitam) (Sumber: Soumare et al., 2020).

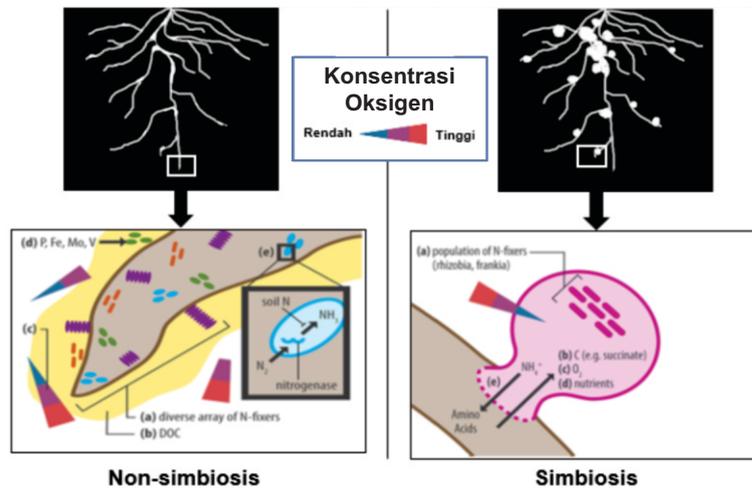
### Mekanisme penambatan nitrogen oleh bakteri penambat nitrogen simbiosis dan non-simbiosis

Beberapa penelitian melaporkan spesies bakteri yang tergolong sebagai bakteri penambat nitrogen simbiosis dengan tanaman seperti *Rhizobium*, *Frankia*, *Anabaena*, dan *Azolla* (Bhat et al., 2015); Soumare et al., 2020). Mekanisme penambatan nitrogen dapat diketahui melalui pembentukan bintil

akar (nodul) pada *Rhizobium*. Mekanisme fiksasi nitrogen pada *Rhizobium* melibatkan faktor *nod* yang disintesis oleh bakteri dan flavonoid yang dilepaskan oleh akar legum. Selanjutnya, bakteri menginfeksi akar tanaman dan masuk ke akar. Gen *nod* merupakan gen pada bakteri yang berfungsi merangsang pembentukan nodul atau bintil akar. Nodul ini berkembang dengan baik, berwarna merah muda

akibat adanya pigmen leghemoglobin (Boyd & Peters, 2013). Pigmen ini dijumpai dalam bintil akar antara bakteroid dan selubung membran yang

mengelilinginya. Berikut skema singkat tentang mekanisme penambat nitrogen oleh bakteri penambat nitrogen simbiosis dan non-simbiosis.



Gambar 3. Skema mekanisme penambatan nitrogen oleh bakteri penambat nitrogen simbiosis dan non-simbiosis (Sumber: Smercina et al., 2019).

Tabel 1. Perbedaan bakteri penambat nitrogen simbiosis dan non-simbiosis

No	Bakteri penambat nitrogen simbiosis	Bakteri penambat nitrogen non-simbiosis
1	Saling berasosiasi dengan tumbuhan	Tidak berasosiasi langsung dengan tumbuhan
2	Menghasilkan nitrogen anorganik untuk tanaman inangnya	Menghasilkan nitrogen anorganik dan melepaskannya ke dalam tanah
3	Sebagian besar bersifat aerobik	Sebagian besar spesies bersifat anaerobik
4	Memperoleh energi dari tanaman inang	Memperoleh energi dari organisme atau sumber lain
5	Contohnya adalah spesies <i>Rhizobium</i>	Contohnya adalah <i>Azotobacter</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Granulobacter</i> dan lainnya

Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa (a) bakteri penambat nitrogen simbiosis dilakukan oleh beberapa bakteri (seperti: Rhizobia dan Frankia) yang hidup membentuk populasi bakteri, (b) bakteri penambat nitrogen non-simbiosis didukung oleh adanya karbon organik terlarut (DOC: *Dissolved Organic Carbon*) di

dalam tanah, sumber C yang bervariasi dan kompleks, sementara bakteri penambat nitrogen simbiosis menerima senyawa karbon sederhana (misalnya suksinat) langsung dari tanaman inang. (c) Konsentrasi oksigen di rizosfer sangat bervariasi dan didukung oleh struktur dan tekstur tanah, serta

respirasi oleh mikroba dan akar. Sebaliknya, bakteri penambat nitrogen simbiosis memperoleh oksigen pada konsentrasi rendah oleh tanaman inangnya. (d) Nutrisi yang diperlukan untuk bakteri penambat nitrogen non-simbiosis (seperti: P, Fe, Mo, dan V) harus diperoleh oleh diazotrof (mikroorganisme penambat N<sub>2</sub>), sedangkan bakteri penambat nitrogen simbiosis memperoleh nutrisi ini dari tanaman inangnya. (e) Diazotrof di rizosfer dapat memperoleh nitrogen dari tanah, sementara semua nitrogen yang terikat secara simbiosis dikirimkan ke tanaman inang (Smercina et al., 2019). Berikut perbedaan bakteri penambat nitrogen simbiosis dan non-simbiosis.

Secara umum fiksasi nitrogen biologis membutuhkan energi sebanyak 16 molekul ATP (Adenosin Trifosfat) untuk memecah sebuah molekul N<sub>2</sub>. Proses tersebut dikatalisis oleh enzim yang terdapat pada bakteri yaitu nitrogenase. Enzim nitrogenase adalah kompleks enzim dengan dua komponen logam yaitu dinitrogenase MoFe (protein molibdenum-besi) yang berfungsi sebagai komponen katalitik dan dinitrogenase reduktase (protein Fe). Kompleks enzim tersebut dikode oleh gen *nif* (Mahmud et al., 2020). Berikut reaksi yang terjadi pada saat reduksi N<sub>2</sub> menjadi NH<sub>3</sub> secara mikro-aerobik:



(Sumber: Mahmud et al., 2020).

Reaksi tersebut terjadi ketika molekul N<sub>2</sub> terikat pada kompleks enzim nitrogenase. Enzim ini akan hancur ketika kontak dengan oksigen. Oleh sebab itu, proses penambatan nitrogen hanya terjadi dalam kondisi anaerob atau oksigen yang dinetralkan dengan leghemoglobin (Boyd & Peters, 2013). Tanaman mendapatkan unsur nitrogen dari proses ini, sementara itu *Rhizobium* memanfaatkan substrat karbon yang berasal dari fotosintesis tanaman.

Bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas atau tidak bersimbiosis (non-simbiosis) seperti *Cyanobacteria* (alga hijau biru), *Azotobacter*, dan *Azospirillum*. Selain itu, beberapa spesies bakteri juga memiliki kemampuan fiksasi nitrogen dengan non-legum seperti *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acetobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Derxia*, *Desulfovibrio*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Lignobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodospirillum*, *Rhodo pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Mycobacterium*

dan *Metilisinus* (Bhat et al., 2015; Soumare et al., 2020).

Salah satu contoh mekanisme penambatan nitrogen oleh bakteri non-simbiosis yaitu *Cyanobacteria* dan *Azotobacter*. Mekanisme pada *Cyanobacteria* terjadi dengan cara memisahkan O<sub>2</sub> yang dihasilkan dari sistem nitrogenase. Pemisahan O<sub>2</sub> pada beberapa kelompok *Cyanobacteria* (genus *Nostoc* dan *Anabaena*) dilakukan melalui heterokis. Sel khusus yang dimiliki oleh *Cyanobacteria* ini berfungsi untuk fiksasi nitrogen. Heterokis memiliki dinding sel tebal yang melindungi kompleks enzim nitrogenase terhadap O<sub>2</sub>. Sementara itu, pada *Cyanobacteria* non-heterokis terjadi pemisahan secara temporal antara proses fiksasi N<sub>2</sub> dan produksi O<sub>2</sub>. Fiksasi nitrogen dilakukan pada kondisi gelap, karena tidak adanya produksi O<sub>2</sub>.

Mekanisme penambatan nitrogen oleh bakteri *Azotobacter* yaitu mempertahankan konsentrasi oksigen yang rendah di dalam sel, dengan cara meningkatkan laju respirasi. Bakteri ini memiliki kemampuan khusus untuk fiksasi nitrogen, meskipun terdapat kandungan oksigen. Ketika konsentrasi oksigen tinggi, maka *Azotobacter* tidak mengaktifkan enzim nitrogenase (Castillo et al., 2020; Soumare et al., 2020). Menurut (Sabra et al. (2000) terdapat kapsul alginat yang terbentuk pada permukaan sel. Kapsul tersebut berfungsi sebagai mekanisme baru untuk melindungi nitrogenase terhadap oksigen.

## METODE ISOLASI DAN PENELITIAN TERKINI BAKTERI PENAMBAT NITROGEN SEBAGAI AGEN BIOFERTILIZER

*Biofertilizer* (pupuk hayati) adalah produk yang mengandung sel-sel hidup dari berbagai jenis mikroorganisme, diaplikasikan pada benih, permukaan tanaman atau tanah, rizosfer atau bagian dalam tanaman dan mendorong pertumbuhan tanaman dengan mengubah unsur-unsur nutrisi penting (seperti: nitrogen dan fosfor) dari tidak tersedia menjadi tersedia melalui proses biologis seperti fiksasi nitrogen dan pelarutan fosfat (Bhat et al., 2015). *Biofertilizer* nitrogen berperan dalam meningkatkan produktivitas tanaman dengan cara meningkatkan BNF (*biological nitrogen fixation*) dan meningkatkan ketersediaan atau penyerapan hara. Selanjutnya, *biofertilizer* nitrogen dapat menggantikan sebagian dari penggunaan pupuk anorganik, mengurangi jumlah, dan biaya pupuk

anorganik. Penelitian Victoria et al. (2019) menunjukkan bahwa aplikasi pupuk hayati pada tanaman bawang merah dapat meningkatkan pertumbuhan dan bobot umbi bawang merah. Selain itu, Hidayat et al. (2020) juga melaporkan bahwa aplikasi konsorsium bakteri penambat nitrogen dan bakteri pelarut fosfat mempengaruhi perubahan karakteristik kimia tanah, pertumbuhan vegetatif dan biomassa tanaman jagung, serta dapat meningkatkan efisiensi pemupukan melalui pengurangan dosis pupuk anorganik hingga 50%. Pada akhirnya dapat mencegah pencemaran lingkungan dari aplikasi pupuk anorganik secara terus menerus.

Isolasi merupakan tahap awal yang dilakukan untuk menentukan strain bakteri yang mampu menambat nitrogen. Jumlah bakteri di tanah bisa mencapai  $10^6 - 10^7$  sel/cm<sup>2</sup> dengan melakukan *culture-dependent* dari sampel tanah di medium tertentu (Igiehon & Babalola, 2018). Beberapa metode isolasi bakteri penambat nitrogen pada rizosfer dijelaskan pada Tabel 2. Pada tanaman kelapa sawit masih belum banyak dilaporkan penelitian terkait bakteri penambat nitrogen yang diisolasi langsung dari

rizosfer kelapa sawit. Berdasarkan penelitian Razak et al. (2019) diketahui bahwa bakteri penambat nitrogen dapat memacu pertumbuhan tanaman kelapa sawit.

Bibit kelapa sawit yang diinokulasikan bakteri BNF secara signifikan lebih tinggi dan nilai klorofil lebih tinggi dibandingkan dengan bibit kontrol tanpa inokulum. Berat kering pucuk dan akar bibit yang diinokulasi juga lebih tinggi daripada kontrol. Pada penampang akar menunjukkan adanya kolonisasi bakteri BNF di dalam jaringan akar. Selain itu, pada tanaman kacang penutup tanah (*legume cover crop*) kelapa sawit yaitu *Mucuna bracteata* juga dilaporkan memiliki simbiosis dengan bakteri penambat nitrogen, seperti yang dilaporkan oleh . Penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Mucuna bracteata* memiliki aktivitas penambatan nitrogen, karena ditemukannya beberapa bakteri penambat nitrogen seperti bakteri dari kelas *Alphaproteobacteria* (*Brevundimonas* sp.), *Betaproteobacteria* (*Achromobacter* sp. dan *Burkholderia* sp.), *Gammaproteobacteria* (*Stenotrophomonas* sp.), dan *Bacillus* sp. Berikut morfologi tanaman dan bintil akar pada *Mucuna bracteata*.



(a)



(b)

Gambar 4. (a) *legume cover crop Mucuna bracteata*, (b) bintil akar pada *Mucuna bracteata* (Sumber: dokumentasi pribadi).

Teknik *culture-dependent* secara rutin digunakan untuk menguji bakteri dari kelompok *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). Metode ini melibatkan kultur mikroorganisme dalam cawan petri atau medium cair untuk mengisolasi dan mempelajari sifat-sifat dari PGPR. Teknik ini juga digunakan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi materi genetik

yang terkait dengan mikroorganisme, namun tidak dapat memperoleh sebagian besar mikroorganisme yang bersifat *unculture* di rizosfer. Hal ini disebabkan karena teknik *culture-dependent* hanya dapat mengisolasi sekitar 1% dari seluruh mikrobioma dalam sampel tanah, sedangkan 99% sisanya dapat dipelajari melalui teknik molekuler atau teknik *culture-*

Tabel 2. Metode isolasi bakteri penambat nitrogen pada rizosfer

Author	Medium	Metode	Hasil
Razak et al., (2019)	NA ( <i>nutrient agar</i> ) dan <i>N-free broth</i>	Pengenceran bertingkat dengan suspensi bakteri mencapai konsentrasi $10^{12}$ CFU/ml	Isolat BNF yang diaplikasikan pada bibit kelapa sawit menunjukkan pertumbuhan yang berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol tanpa inokulum
Zulfarina et al., (2017)	<i>N-free liquid medium</i> dan reagen fenol	Pengenceran bertingkat dan aktivitas fiksasi nitrogen ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru	Kelimpahan bakteri penambat nitrogen ditemukan lebih tinggi sebagai bakteri nitrifikasi
Arsita et al., (2020)	<i>N-free medium,</i> <i>semisolid Nfb</i> dan <i>bromotimol blue</i>	Pengenceran bertingkat, perubahan warna dalam media semisolid dari hijau menjadi biru menunjukkan adanya aktifitas fiksasi nitrogen, ekskresi amonium dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri	Pada penelitian ini ditemukan 5 isolat dengan kemampuan sebagai penghasil amonium dengan konsentrasi tinggi
Hamza et al., (2017)	<i>Azotobacter medium, YEMA</i> ( <i>yeast extract mannitol agar</i> ) <i>medium</i>	Menggunakan medium spesifik sesuai target bakteri. <i>Azotobacter</i> medium untuk bakteri <i>Azotobacter</i> dan YEMA medium untuk <i>Rhizobium</i>	Isolat bakteri yang diperoleh yaitu 2 isolat <i>Azotobacter</i> dan 1 isolat <i>Rhizobium</i>

*independent* (Igiehon & Babalola, 2018). Seiring dengan perkembangan zaman, maka teknologi yang digunakanpun semakin maju. Pada umumnya penelitian terkini cenderung untuk menggunakan teknik molekuler, salah satunya yaitu teknik *culture-independent* seperti *next generation sequencing* (NGS). Teknik ini menunjukkan prospek yang lebih baik untuk menemukan novel strain yang memiliki sifat sebagai pemacu pertumbuhan tanaman. Teknik NGS memiliki dampak terbesar pada DNA dan teknik analisis berbasis RNA, dikarenakan NGS dapat memberikan solusi untuk masalah yang tidak bisa diselesaikan sebelumnya, seperti dalam hal finansial dan teknis. Oleh karena itu, mikrobioma terkait tanaman saat ini dapat dipelajari dengan lebih cepat dan mendalam dari pada sebelumnya.

#### **Prospek penelitian lanjutan terkait bakteri penambat nitrogen**

Pada masa yang akan datang pilihan strain bakteri merupakan tugas penting, karena strain yang efisien sebagai bakteri penambat nitrogen sama pentingnya dalam produksi pupuk hayati, sebagaimana benih dalam budidaya tanaman. Dengan demikian, perlu menggunakan strain dari sumber yang dapat dipercaya untuk produksi skala besar mikroorganisme penambat nitrogen. Menurut Soumare et al. (2020) perlu pemahaman lebih lanjut tentang BNF dengan tanaman non-legum. Selain itu, rekayasa tanaman non-legum dapat dilakukan untuk dapat membentuk nodul dan bersimbiosis seperti halnya tanaman legum dengan *Rhizobium*. Oleh karena itu, perlu penelitian untuk menghasilkan simbiosis buatan berupa fiksasi nitrogen asosiatif pada tanaman non-legum, terutama serealialia seperti beras, gandum dan jagung. Penelitian untuk bakteri penambat nitrogen pada tanaman lainnya masih menjadi pilihan penting bagi peneliti di masa yang akan datang, karena pada umumnya penelitian saat ini terbatas pada tanaman legum dan beberapa tanaman serealialia.

Igiehon & Babalola (2018) melaporkan bahwa pada masa yang akan datang perlu mengembangkan PGPR yang dimodifikasi secara genetik untuk meningkatkan kinerja tanaman, karena lebih mudah untuk memodifikasi bakteri daripada organisme kompleks yang lebih tinggi. Inokulan tunggal yang direkayasa juga dapat digunakan untuk beberapa tanaman, terutama bila menggunakan genus non-

spesifik seperti *Azospirillum*. Selanjutnya, rekayasa genetika dapat digunakan untuk mengembangkan bakteri yang efektif dengan inokulum dosis rendah dan tahan pada berbagai kondisi lingkungan (seperti kondisi kekeringan, pH rendah, salinitas tinggi dan lainnya).

#### **KESIMPULAN**

*Biofertilizer* yang mengandung agen hayati penambat nitrogen dapat membantu dalam meningkatkan produktivitas tanaman dengan cara meningkatkan BNF, peningkatan ketersediaan atau penyerapan hara. *Biological nitrogen fixation* tersebut dapat digunakan sebagai alternatif pengganti sebagian penggunaan pupuk anorganik, sehingga dapat mencegah pencemaran lingkungan dan dapat membantu tercapainya pertanian yang berkelanjutan.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Arsita, R., Karim, H., Hala, Y., Iriany, N., & Jumadi, O. (2020). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria in the corn rhizosphere (*Zea mays* L.) originating from Jeneponto Regency, South Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 484(012051), 1–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/484/1/012051>
- Bhat, T. A., Ahmad, L., Ganai, M. A., Shams-UI-Haq, & Khan, O. A. (2015). Nitrogen fixing biofertilizers; mechanism and growth promotion: A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(2), 1675–1690.
- Boyd, E. S., & Peters, J. W. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, 4(201), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>
- Castillo, T., García, A., Padilla-Córdova, C., Díaz-Barrera, A., & Peña, C. (2020). Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 48(2020), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.08.001>
- Cherkasov, N., Ibhaddon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2015).

- A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing*, 90(2015), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>
- Hamza, T. A., Hussein, Z., Mitku, R., Ayalew, P., & Belayneh, T. (2017). Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Bacteria from Rhizosphere Soil Collected from Shell Mele Agricultural Center, Southern Ethiopia. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 3(7), 117–124.
- Hidayat, F., Sembiring, Z., Afrida, E., & Balatif, F. (2020). Aplikasi Konsorsium Bakteri Penambat Nitrogen dan Pelarut Fosfat Untuk Meningkatkan Pertumbuhan Jagung (*Zea mays*). *Jurnal Tanah Dan Sumberdaya Lahan*, 7(2), 249–254. <https://doi.org/10.21776/ub.jtsl.2020.007.2.8>
- Iggehon, N. O., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: Contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040574>
- Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., Laghari, A. H., Bhabhan, G. M., Talpur, K. H., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A., & Lashari, A. A. (2016). Role of Nitrogen for Plant Growth and Development: A review. *Advances In Environmental Biology*, 10(9), 209–218.
- Li, S. X., Wang, Z. H., & Stewart, B. A. (2013). Responses of Crop Plants to Ammonium and Nitrate N. In *Advances in Agronomy* (pp. 205–397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405942-9.00005-0>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Martinez-Dalmau, J., Berbel, J., & Ordonez-Fernandez, R. (2021). Nitrogen Fertilization. A Review of the Risks Associated with the Inefficiency of Its Use and Policy Responses. *Sustainability*, 13(5625), 1–15. <https://doi.org/10.3390/su13105625>
- Pinton, R., Varanini, Z., & Nannipieri, P. (2007). The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface Second Edition. In *Taylor & Francis Group* (pp. 1–316).
- Razak, I. B. A., Sha'ari, S. H., Fishal, E. M. M., Bohari, N. H., & Ibrahim, H. (2019). The Effectiveness of Biological Nitrogen Fixation Bacteria on the Growth of Oil Palm Seedling. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-J A V S )*, 12(10), 58–65. <https://doi.org/10.9790/2380-1210015865>
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lunsdorf, H., & Deckwer, W. D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4037–4044. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000>
- Saikia, S. P., & Jain, V. (2007). Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma?. *Current Science*, 92(3), 317–322.
- Salwani, S., Amir, H. G., & Najimudin, N. (2012). Evidence of diazotrophic symbionts in the leguminous cover crop *Mucuna bracteata*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 35(3), 537–552.
- Shi, R., Zhang, X., Waterhouse, G. I. N., Zhao, Y., & Zhang, T. (2020). The Journey toward Low Temperature, Low Pressure Catalytic Nitrogen Fixation. *Advanced Energy Materials*, 2000659(2020), 1–10. <https://doi.org/10.1002/aenm.202000659>
- Simanungkalit, R. D. M., Saraswati, R., Hastuti, R. D., & Husen, D. E. (2004). Bakteri Penambat Nitrogen. In *Pupuk Organik dan Pupuk Hayati* (pp. 113–140).
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouismi, L. (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route. *Plants*, 9(2020), 1–22. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., Tiemann, L. K. (2019). To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6),

- 1-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>.
- Victoria, T. V., Hidayat, F., & Tyasmoro, S. Y. (2019). Pengaruh Pemberian Dosis Pupuk NPK dan Hayati terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) The Effect of NPK fertilizer and Biofertilizer on the Growth and Yield of Shallots (*Allium ascalonicum* L.). *Jurnal Produksi Tanaman*, 7(11), 2151–2160.
- Wagner, S. C. (2011). *Biological Nitrogen Fixation*. Nature Education Knowledge. Retrieved from <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/>
- Zulfarina, Z., Rusmana, I., Mubarik, N. R., & Santosa, D. A. (2017). The Abundance of Nitrogen Fixing, Nitrifying, Denitrifying and Ammonifying Bacteria in the Soil of Tropical Rainforests and Oil Palm Plantations in Jambi. *Makara Journal of Science*, 21(4), 187–194. <https://doi.org/10.7454/mss.v21i4.8841>