

Potensi Bakteri Pelarut Fosfat pada Lahan Tegakan Hutan dan Perkebunan Singkong di Kawasan Kampus IPB Dramaga Bogor

The Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria in Forest Stand Land and Cassava Plantation in the IPB Dramaga Campus Area, Bogor

Maulidi Firlandiana^{1,*}, Yaumil Khairiyah², Iwan Perala³, Dhina Mustikaningrum¹, Kristiawan¹, Maimunah¹, Suprayitno¹, Herry Prasetya¹, Subiyanto¹, Abdi Dewi Setyana¹

¹)Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sunan Bonang
Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo No.798, Sidorejo, Kec. Tuban, Tuban, 62315

²)Program Studi Agroteknologi, Universitas Amir Hamzah
Jl. Pancing Pasar V Barat, Medan Estate, Kec. Percut Sei Tuan, Deli Serdang, 20371

³)Sekolah Pascasarjana, IPB University
Jl. Raya Darmaga, Gedung Sekolah Pascasarjana IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

*Email : firlandiana95@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman memerlukan nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan dan perkembangan, salah satunya yaitu fosfor (P). Namun tanaman hanya dapat menyerap P dari tanah dalam bentuk ion fosfat ($H_2PO_4^-$ dan HPO_4^{2-}). Tantangan besar yang dilakukan untuk menyediakan P terlarut atau tersedia, terjawab oleh penemuan Bakteri Pelarut Fosfat (BPF). Mikrob ini menghasilkan asam-asam organik yang dapat melarutkan senyawa fosfat kompleks dan atau mengikat kation dari ion (PO_4^{3-}) untuk melepaskan P tersedia dalam tanah. Areal rhizosfer tanah memiliki potensi keragaman mikrob yang tinggi karena menyediakan sumber makanan (eksudat) yang dikeluarkan dari akar tanaman. Penelitian ini bertujuan menentukan kualitas isolat BPF dari ekosistem perkebunan singkong dan hutan Kampus IPB Dramaga dengan Indeks Pelarut Fosfat (IPF) tertinggi pada berbagai sumber P dan variasi pH serta menentukan isolat BPF yang bersifat non-patogenik terhadap manusia, hewan, dan tanaman. Penelitian ini diawali dengan mengisolasi BPF dari areal rhizosfer, menumbuhkannya

pada media selektif *Pikovskaya*, identifikasi morfologi koloni secara makroskopis, seleksi koloni BPF yang menghasilkan *halozone* (zona bening), mengukur IPF, dan mengujinya pada media *Pikovskaya* dengan berbagai sumber P dan tingkatan pH. Hasil isolasi menunjukkan adanya 9 isolat 2 diantaranya dari tegakan hutan dan 7 dari perkebunan singkong yang menghasilkan *halozone*. Isolat 6P dan 7P dari tegakan hutan memiliki IPF tertinggi berturut-turut sebesar 3,10 dan 3,33. Adapun isolat BPF hanya dapat mengasilkan *halozone* pada media sumber P dari kompleks Ca-P dengan kondisi pH basa dan pH tanah. Dari 9 isolat terpilih, 6 diantaranya yaitu isolat 1P, 3P, 4P, 6P, 7P, dan 9P teruji bersifat non-patogen terhadap sel manusia, hewan, maupun tanaman.

Kata Kunci: Bakteri Pelarut Fosfat, Isolasi, Rhizosfer, Uji Patogenitas

ABSTRACT

Plants require adequate nutrients for growth and development, one of which is phosphorus (P). However, plants can only

absorb P from the soil in the form of phosphate ions (H_2PO_4^- and HPO_4^{2-}). The great challenge of providing dissolved or available P was answered by the discovery of Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB). These microbes produce organic acids that can dissolve complex phosphate compounds and/or bind the cation of the ion (PO_4^{3-}) to release available P in the soil. The soil rhizosphere area has the potential for high microbial diversity because it provides a food source (exudate) released from plant roots. This study aims to determine the quality of PSB isolates from the cassava plantation ecosystem and the forest of IPB Dramaga Campus with the highest Phosphate Solubilization Index (PSI) at various P sources and pH variations and determine BPF isolates that are non-pathogenic to humans, animals, and plants. This study began with isolating PSB from the rhizosphere area, growing them on Pikovskaya selective media, macroscopic identification of colony morphology, selection of PSB colonies that produce halozone (clear zone), measuring PSI, and testing them on Pikovskaya media with various P sources and pH levels. The isolation results showed that there were 9 isolates, 2 of which were from forest stands and 7 from cassava plantations that produced halozone. Isolates 6P and 7P from forest stands have the highest IPF of 3.10 and 3.33, respectively. The PSB isolates can only produce halozone on P source media from Ca-P complexes with alkaline pH and soil pH conditions. Of the 9 selected isolates, 6 of them, namely isolates 1P, 3P, 4P, 6P, 7P, and 9P, were tested to be non-pathogenic to humans, animals, and plants cells.

Keywords: Isolation, Pathogenicity Test, Phosphate Solubilizing Bacteria, Rhizosphere

PENDAHULUAN

Fosfor (P) merupakan unsur esensial bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Pada tingkat sel tanaman, fosfor memiliki fungsi sebagai komponen molekul biologi seperti DNA,

RNA, ATP, dan fosfolipid penyusun dinding sel. Pada tingkat makro, fosfor memiliki fungsi dalam mempengaruhi perkembangan akar dan batang, kekuatan batang, dan kematangan tanaman (Sharon *et al.*, 2016). Permasalahan utama terkait ketersediaan fosfor dalam tanah adalah tanaman hanya dapat menyerap P dari tanah dalam bentuk ion fosfat. Beberapa ion fosfat yang dapat diserap oleh tanaman di dalam larutan tanah dalam bentuk fosfat H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} . Ion-ion tersebut ditemukan pada kondisi pH tertentu seperti pH masam yang lebih didominasi oleh ion H_2PO_4^- , sedangkan bentuk ion HPO_4^{2-} lebih dominan ditemukan pada pH lebih tinggi (>7) (Novriani, 2010). Tantangan besar yang harus dilakukan untuk menyediakan P dalam bentuk terlarut atau tersedia untuk tanaman terjawab oleh penemuan Bakteri Pelarut Fosfat (BPF). Mikrob ini dapat menghasilkan asam – asam organik yang dapat melarutkan senyawa fosfat kompleks dan atau mengikat kation dari ion (PO_4^{3-}) untuk melepaskan P tersedia di dalam sistem lingkungan tanah (Sharon *et al.*, 2016).

Tegakan hutan maupun perkebunan singkong memiliki potensi keragaman mikrob yang tinggi karena menyediakan sumber makanan berupa eksudat yang dikeluarkan dari akar tanaman. Menurut penelitian Widawati & Suliasih (2006) menyatakan populasi bakteri pelarut fosfat yang ditemukan pada areal rhizosfer lebih tinggi dibandingkan daerah non-rhizosfer. Hal tersebut disebabkan karena daerah rhizosfer lebih dekat dengan posisi akar dimana dapat mensekresikan bahan organik yang dapat mencukupi dan merangsang pertumbuhan bakteri.

Kondisi tanah di Indonesia yang rata-rata bersifat masam ($\text{pH} < 7$), P cenderung untuk bersenyawa dalam bentuk Fe-P dan Al-P. Adapun pada tanah cenderung basa, P akan cenderung bersenyawa dalam bentuk Ca-P (Novriani, 2010). Bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari tanah di areal rhizosfer pada tegakan hutan dan perkebunan singkong diharapkan dapat memiliki kemampuan pelarutan fosfat yang baik pada jenis tanah yang bersifat masam. Adapun untuk tujuan jangka panjang yaitu sebagai objek yang dapat

dikomersilkan, perlu diketahui lebih lanjut kemampuan isolat BPF tersebut dalam melarutkan fosfat pada kondisi asam maupun basa.

Penelitian ini bertujuan guna menentukan isolat BPF dengan Indeks Pelarut Fosfat (IPF) terbaik; melihat kemampuan pelarutan fosfat oleh BPF pada berbagai sumber P berbeda (Fe-P; Ca-P; dan Al-P) dan variasi pH; isolat BPF yang memiliki sifat non-patogen terhadap manusia, hewan, dan tumbuhan dengan cara uji *blood agar* dan uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanah, Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Dramaga. Sampel tanah diambil dari lahan hutan Fakultas Kehutanan IPB dan lahan percobaan Cikabayan IPB. Penelitian dimulai tanggal 26 Agustus s.d. 23 November 2019.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: *Laminar Air Flow (LAF)*, *autoclaf*, pH meter, *rotary shaker*, *oven*, *vortex*, *magnetic stirrer*, *micropipet*, *sprayer* alkohol, erlenmeyer, timbangan, mikroskop stereo, rak tabung, gelas ukur, jarum ose, batang L, cawan petri, bunsen, dan alat-alat laboratorium yang lain.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain: Glukosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, KCl, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ekstrak ragi, agar, *blood agar*, aquades, alkohol steril, spirtus, larutan fisiologis, plastik *wrap*, tip, kapas, *aluminium foil*, plastik anti panas, dan tanaman tembakau.

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan mengambil sampel tanah dari 2 ekosistem yaitu tegakan hutan tropis dan tegakan perkebunan singkong. Dari masing-masing sampel tersebut diambil 2 ulangan sehingga terdapat 4 sampel tanah yang siap dilakukan isolasi BPF.

Masing-masing sampel tersebut diencerkan menggunakan seri pengenceran

bertingkat dari 10^{-1} sampai 10^{-4} . Kemudian mikroba diisolasi dari sampel tanah tersebut pada seri pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} . Sebelumnya telah dilakukan percobaan awal dengan mengisolasi sampai pengenceran ke-6 namun BPF sudah tidak tumbuh, sehingga diambil seri pengenceran maksimal ke-4. Pada tiap tingkat pengenceran, dibuat 3 kali ulangan (triplo). Sehingga jumlah media yang harus disiapkan berjumlah 2 sampel x 3 tingkat seri pengenceran x 3 ulangan pengenceran = 18 media pada cawan petri.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel Tanah dan Pengukuran pH

Sampel diambil dari 2 jenis tanah pada tegakan hutan tropis dan perkebunan singkong di wilayah Kampus IPB Dramaga. Tanah diambil secara random pada 5 titik sampel (masing-masing sebanyak ± 20 gram) dan dilakukan komposit. Penggalian tanah dilakukan menggunakan alat cangkul di kedalaman 15 – 20 cm pada areal perakaran tanaman (*rhizosphere*). Selanjutnya sampel tanah yang telah dikomposit akan disimpan pada refrigerator tanah guna dilakukan pengujian selanjutnya yaitu isolasi mikroba. Sampel tanah juga diambil untuk dilakukan pengukuran pH guna sebagai bahan analisis faktor tumbuh BPF.

Persiapan Alat dan Bahan

Disiapkan seluruh alat dan bahan yang diperlukan untuk isolasi BPF. Pertama-tama dibuat larutan fisiologis steril yaitu NaCl 0,85% dengan cara mengencerkan 8,5 gram garam NaCl ke dalam aquades 1 L. Selanjutnya dibuat media selektif *Pikovskaya* untuk menumbuhkan mikroba pelarut fosfat. Pertama ditimbang terlebih dahulu seluruh bahan-bahan pembuat medium selektif *Pikovskaya* sesuai komposisi setiap bahan. Kemudian ditambahkan aquades dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah media agar tercampur merata, selanjutnya disterilisasi di dalam *autoclaf* (pada suhu 121°C , tekanan 15 psi selama 30 menit) bersama alat-alat isolasi yang diperlukan

seperti cawan petri, tip untuk pengenceran menggunakan mikropipet, batang L, tabung reaksi yang telah diisikan larutan fisiologis, serta erlenmeyer yang telah diisikan larutan fisiologis.

Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang telah disterilisasi menggunakan *autoclaf*, dapat dikeringkan terlebih dahulu di dalam *oven*. Adapun media tumbuh mikroba dapat dibiarkan dingin sampai pada suhu hangat (kuku). Di sisi lain, disiapkan *Laminar Air Flow (LAF)* agar kondisinya steril dengan cara menyemprotkan alkohol di seluruh ruangan *LAF* kemudian menyalakan sinar UV selama 15 menit.

Setiap sampel tanah ditimbang sebanyak 10 gram. Dimasukkan sampel tanah tersebut secara aseptis ke dalam tabung erlenmeyer 250 ml yang telah diisikan 90 ml larutan fisiologis steril (proses dilakukan di dalam *LAF*). Ditutup kembali erlenmeyer tersebut dan dihomogenkan selama 30 menit di atas *rotary shaker*. Larutan tanah tersebut kemudian diencerkan bertingkat secara aseptis di dalam *LAF* dengan cara mengambil sebanyak 1 ml larutan tanah menggunakan mikropipet dan memasukkannya ke dalam tabung reaksi pertama. Larutan dihomogenisasi menggunakan *vortex* sampai tercampur merata. Tabung pertama ini merupakan seri pengenceran 10^{-2} . Kemudian selanjutnya dilakukan hal yang sama sampai pada seri pengenceran 10^{-4} .

Isolasi BPF dengan Metode *Spread Plate*

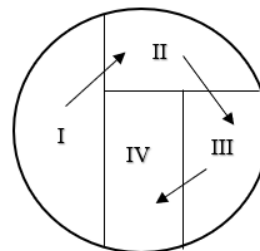
Dipipet sebanyak 0,1 ml pada larutan tanah pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} serta masing-masing dilakukan triplo. Mikroba yang telah dituangkan di atas media selektif *Pikovskaya* padat kemudian diratakan seluruh permukaan medium menggunakan batang L. Ditutup cawan petri secara rapat menggunakan *plastic wrap*. Mikroba yang telah diisolasi di dalam media tersebut kemudian ditumbuhkan pada suhu ruang selama 3 – 7 hari. Seluruh proses isolasi dilakukan secara aseptis di dalam *LAF*.

Pengamatan Morfologi Koloni Isolat BPF

Pada hari ketujuh isolasi BPF, selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi koloni BPF pada masing-masing sampel dengan melihat parameter, seperti: bentuk koloni, permukaan/elevasi koloni, dan warna koloni (Babu *et al.*, 2017).

Purifikasi (Koloni Murni)

Dibuat media selektif *Pikovskaya* kembali untuk proses purifikasi BPF. Dilakukan pemilihan koloni yang menghasilkan *halozone* atau zona bening yang mengindikasikan adanya aktifitas BPF dalam melarutkan fosfat dari ikatan-ikatan fosfat tak larut (sekresi asam organik) atau mineralisasi fosfat dari bentuk ikatan fosfat organik menjadi fosfat non-organik. Diambil koloni BPF menggunakan jarum ose dan menggoreskannya secara *streak* pada 4 kuadran. Prinsipnya akan muncul mikroba tunggal pada gesekan terakhir di kuadran IV karena mikroba yang terbawa ose semakin menurun. Sehingga dari proses ini akan didapatkan mikroba murni yang dapat diidentifikasi lanjut morfologi maupun sifat patogenitasnya.



Gambar 1 Arah Goresan pada Media Selektif *Pikovskaya* untuk Purifikasi Isolat BPF

Menghitung Indeks Pelarut Fosfat (IPF)

Diambil isolat murni BPF dari hasil purifikasi setiap sampel, dan ditanamkan pada tengah cawan petri yang telah diberi media selektif *Pikovskaya* padat. Ditumbuhkan pada suhu 28°C selama 7 hari, dan diukur diameter *haloxone* atau zona bening dan diameter koloni mikroba yang tumbuh. Setiap sampel dibuat triplo. Dilakukan pengamatan morfologi lanjutan untuk koloni tunggal (Pande *et al.*, 2017). Berikut rumus Indeks Pelarutan Fosfat:

$$IPF = \frac{\text{Diameter koloni} + \text{Diameter Holozone}}{\text{Diameter koloni}}$$

Menguji Kemampuan Pelarutan Fosfat pada Berbagai Sumber P dan pH

Koloni yang memiliki IPF tinggi akan diseleksi untuk selanjutnya ditumbuhkan pada media padat *Pikovskaya* dengan sumber P berbeda dan tingkatan pH. Sumber P yang digunakan yaitu kompleks Ca-P, Al-P, dan Fe-P. Masing-masing media *Pikovskaya* dengan sumber P tersebut dibuat dengan pH berbeda-beda yaitu pH tanah (pH=rata-rata 3,81), pH asam (pH=4), dan pH basa (pH=9).

Pembuatan Stok Kultur BPF

Diambil pada satu koloni bakteri pelarut fosfat dengan menggunakan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada medi selektif *Pikovskaya* miring steril dengan cara menggores, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Isolat yang telah diremajakan tersebut digunakan sebagai *culture stock* dan *working stock*.

Uji Patogenitas

Pengujian patogenitas digunakan untuk mengetahui sifat patogen isolat BPF terhadap sel manusia, hewan, maupun tumbuhan. Pada sel manusia atau hewan, uji patogenitas menggunakan agar darah (*blood agar*). Langkah yang dilakukan yaitu dengan menggoreskan isolat BPF di atas media agar darah yang telah memadat kemudian diinkubasi dengan suhu ruang selama 24 jam. Media agar darah dibuat dari medium basal dengan penambahan darah hewan ternak (domba) 5-10% (defibrinasi) pada suhu 50-60%. Terbentuknya zona *halozone* atau zona bening menunjukkan bahwa isolat mampu melisis darah. Proses lisis yang tidak nyata menyebabkan tidak terjadi perubahan warna pada media. Adapun uji patogenitas pada sel tanaman dilakukan melalui reaksi hipersensitif. Pengujian dilakukan dengan cara menyuntikan suspensi bakteri ke dalam jaringan daun tanaman tembakau. Perkembangan gejala klorosis diamati hingga 4 hari (Danaatmadja *et al.*, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Morfologi Isolat BPF

Tanah yang diisolasi memiliki pH sebesar 3,59 untuk tegakan hutan dan 4,03 pada perkebunan singkong. Rata-rata pH tersebut 3,81. Adapun isolasi BPF dari kedua tegakan tersebut menghasilkan sebanyak 9 (sembilan) isolat dengan karakteristik morfologi yang disajikan pada Tabel 1.

Pengamatan morfologi koloni isolat BPF didasarkan atas parameter bentuk, warna, dan permukaan/elevasi (Babu *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil pengamatan koloni BPF, menunjukkan bahwa seluruh isolat menghasilkan koloni dengan tekstur timbul. Koloni isolat 1P, 4P, 6P, 7P, dan 9P memiliki kesamaan karakteristik morfologi koloni yaitu berwarna putih kusam dan tepian memiliki bentuk tak beraturan. Koloni isolat 2P memiliki karakteristik yang sangat berbeda dengan isolat lain yaitu berwarna kuning cerah dengan warna merah di tengahnya, bertekstur halus timbul, dan berbentuk sirkular tak beraturan. Adapun karakteristik koloni isolat 3P memiliki bentuk sirkular bergerigi, warna putih benih, dan permukaan kasar menyerupai kristal. Koloni isolat 5P memiliki karakteristik bentuk tepian tak beraturan warna kelabu dengan node hitam di permukaannya, serta bertekstur timbul. Koloni isolat 8P memiliki karakteristik berwarna kuning, bentuk tak beraturan, dan bertekstur kasar. Apabila diamati, karakteristik koloni isolat yang ditemukan pada tegakan hutan (isolat 6P dan 7P) memiliki kemiripan. Adapun isolat yang ditemukan pada tegakan perkebunan singkong sangat bervariasi karakteristik morfologi koloninya. Karakteristik yang berbeda tersebut disebabkan karena ekspresi gen dari jenis bakteri yang berbeda jenisnya (Fakkrudin *et al.*, 2013).

Kemampuan Pelarutan Fosfat dengan Indeks Pelarut Fosfat (IPF)

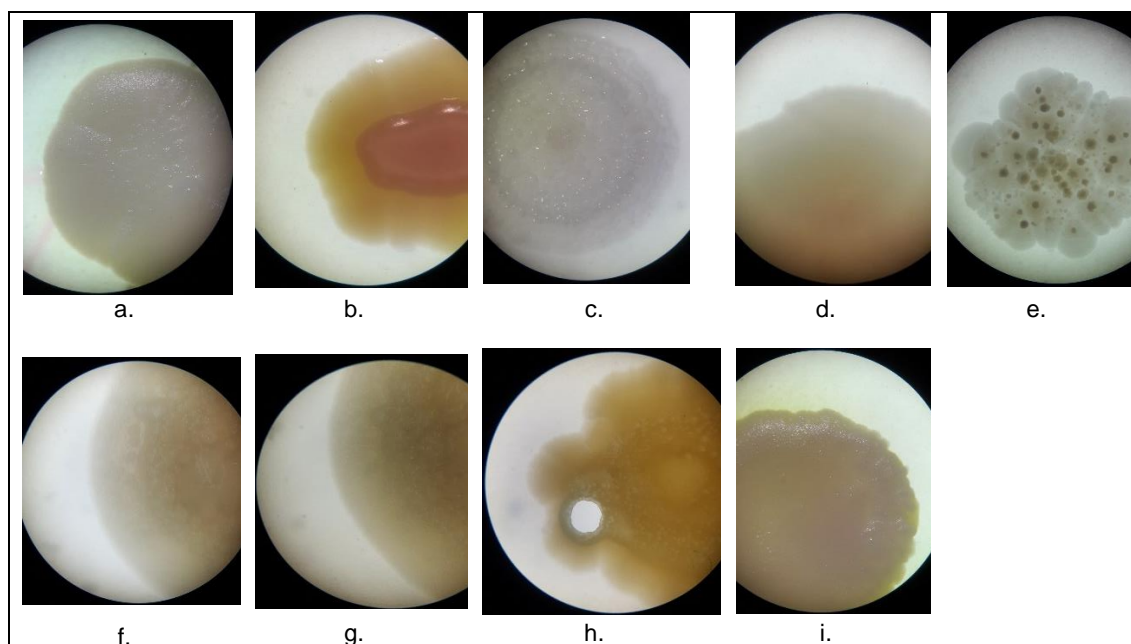
Indeks pelarut fosfat (IPF) menunjukkan kemampuan isolat dalam melarutkan P secara kualitatif yang ditandai

dengan kemampuan dalam membentuk *holozone* atau zona bening yang berwarna terang dan jernih mengelilingi koloni. Pengukuran kemampuan BPF pada media selektif *Pikovskaya* dilakukan pada hari ke-7 masa inkubasi. Perhitungan pengukuran

zona bening dilakukan dengan cara memilih jenis bakteri yang memiliki karakteristik berbeda.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Makroskopis Koloni BPF

Isolat	Sumber	Bentuk	Warna	Permukaan
1P	Singkong	Sirkular tak beraturan	Putih kusam	Timbul, halus
2P	Singkong	Sirkular tak beraturan	Kuning, merah tengah	Timbul, halus
3P	Singkong	Sirkular bergerigi	Putih bening	Kristal
4P	Singkong	Sirkular tak beraturan	Putih kusam	Halus
5P	Singkong	Tak beraturan	Kelabu	Timbul, tak beraturan
6P	Hutan	Sirkular tak beraturan	Putih kusam	Timbul, bertekstur
7P	Hutan	Sirkular tak beraturan	Putih kusam	Timbul, bertekstur
8P	Singkong	Tak beraturan	Kuning	Timbul, bertekstur
9P	Singkong	Sirkular tak beraturan	Putih kusam	Timbul, halus



Gambar 2. Morfologi koloni hari ke-7 Inokulasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari Tegakan Hutan dan Perkebunan Singkong Cikabayan, Kampus IPB Dramaga
Keterangan: a) Isolat 1P; b) Isolat 2P; c) Isolat 3P; d) Isolat 4P; e) Isolat 5P; f) Isolat 6P; g) Isolat 7P; h) Isolat 8P; i) Isolat 9P

BPF yang dapat membentuk zona bening paling cepat dengan diameter paling besar secara kualitatif di sekitar koloni menunjukkan besar kecilnya potensi BPF dalam melarutkan unsur P dari bentuk yang tidak terlarut (Widawati & Suliasih, 2006)..

Hasil perhitungan potensi bakteri dalam melarutkan P dengan menggunakan nilai indeks pelarutan P dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengukurannya, nilai IPF yang tinggi dan memiliki kemampuan

tumbuh yang cepat diperoleh dari isolat 7P dan 6P dengan nilai berturut-turut sebesar 3,33 dan 3,10. Kemampuan dalam melarutkan fosfat ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Hal ini terjadi karena adanya asam organik yang diekskresikan oleh bakteri dan kemudian berikatan dengan ion Ca dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pada media Pikovskaya dan membebaskan H_2PO_4 sehingga membentuk area yang berwarna jernih (Widawati & Suliasih, 2006).

Luas zona bening di sekitar koloni menjelaskan kemampuan BPF secara kualitatif dapat melarutkan P dengan tergantung sifat genetik dari masing-masing mikroba dalam memproduksi asam organik yang berperan dalam menentukan pelarutan P (Mittal *et al.*, 2008). Semakin luas dan bening *holozone* yang terbentuk, semakin kuat BPF tersebut dapat melarutkan P.

Tabel 2 Indeks Pelarut Fosfat (IPF) pada Hari ke-7 Pengamatan Menggunakan Medium Selektif Pikovskaya dengan Ca_3PO_4 sebagai Sumber P

Isolat	Sumber	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	IPF
1P	Singkong	11,5	7	2,64
2P	Singkong	12	7,5	2,60
3P	Singkong	10	8	2,25
4P	Singkong	16	9	2,78
5P	Singkong	7	6	2,17
6P	Hutan	21	10	3,10
7P	Hutan	21	9	3,33
8P	Singkong	11	8	2,38
9P	Singkong	14,5	8	2,81

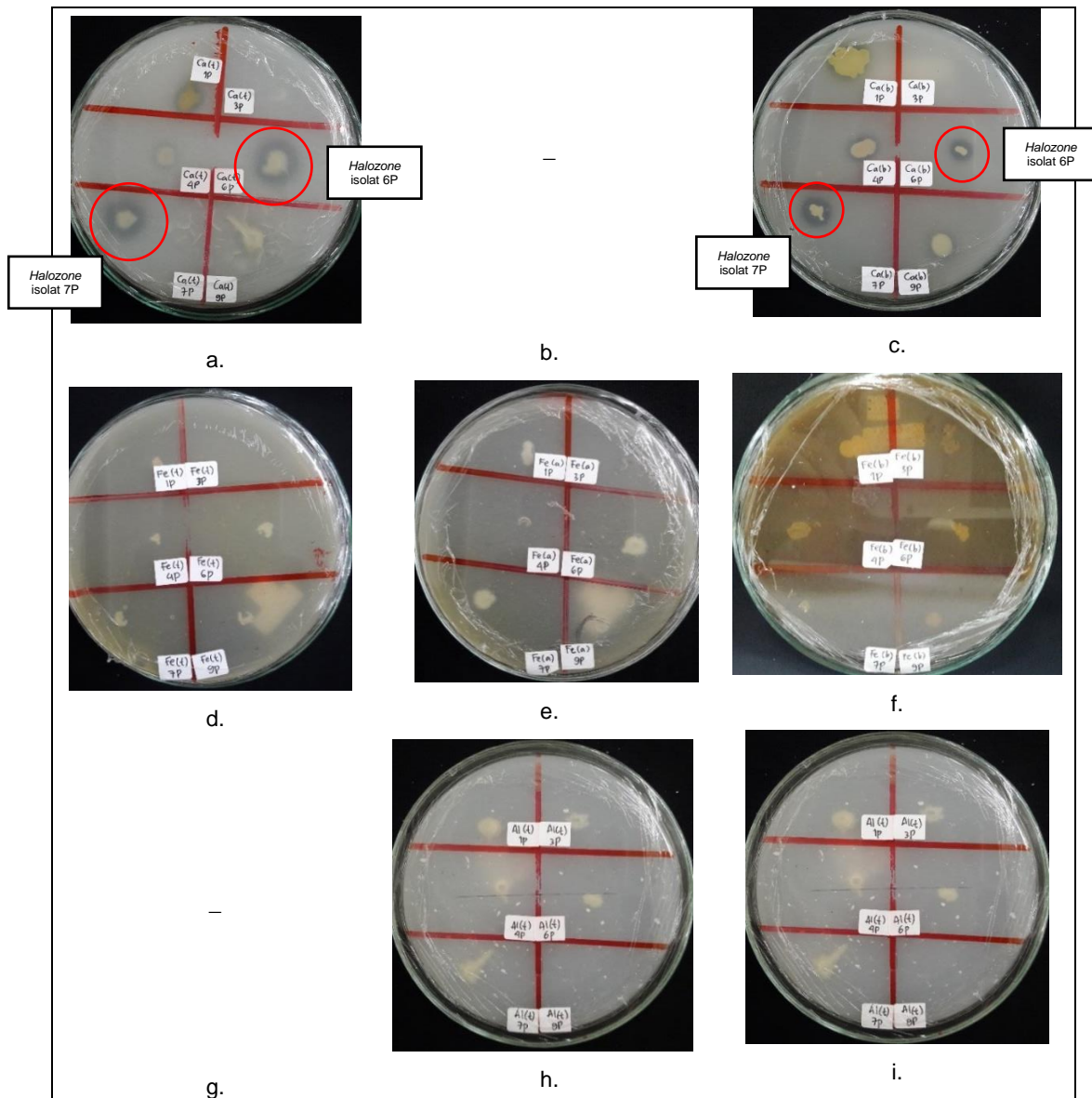
Kemampuan Melarutkan Fosfat pada Berbagai Sumber P

Sumber P yang terdapat dari dalam tanah beraneka ragam. Tanah masam seperti pada sampel tanah perkebunan singkong maupun hutan Kampus IPB Dramaga lebih banyak bersenyawa dengan kompleks Al-P dan Fe-P (Novriani, 2010). Percobaan dilakukan pada beberapa sumber P lain seperti Ca-P untuk mengukur kualitas pelarutan fosfat. Berikut hasil percobaan BPF yang diaplikasikan pada medium selektif Pikovskaya dengan berbagai sumber P (Ca-P, Al-P, dan Fe-P) dan tingkatan pH (pH tanah=rata-rata 3,81; pH asam=4; pH basa=9) untuk melihat kualitas BPF dalam melarutkan fosfat melalui Indeks Pelarut Fosfat.

Tabel 2. Status Pembentukan *Holozone* Pelarut Fosfat pada Isolat BPF dengan Berbagai Sumber P dan pH pada Hari ke-5 Inokulasi

Perlakuan	1P	3P	4P	6P	7P	9P
Ca-P (pH tanah)	+	+	+	+	+	+
Ca-P (pH asam)	TT	TT	TT	TT	TT	TT
Ca-P (pH basa)	+	+	+	+	+	+
Fe-P (pH tanah)	-	-	-	-	-	-
Fe-P (pH asam)	-	-	-	-	-	-
Fe-P (pH basa)	-	-	-	-	-	-
Al-P (pH tanah)	-	-	-	-	-	-
Al-P (pH asam)	TT	TT	TT	TT	TT	TT
Al-P (pH basa)	-	-	-	-	-	-

Keterangan: TT= Tidak Terinokulasi



Gambar 4 Ragaan Wilayah Holozone Isolat BPF dengan Berbagai Sumber P dan pH pada Hari Ke-5 Inokulasi

Keterangan : a) Ca-P (pH tanah); b) Ca-P (pH asam); c) Ca-P (pH basa); d) Fe-P (pH tanah); e) Fe-P (pH asam); f) Fe-P (pH basa); g) Al-P (pH tanah); h) Al-P (pH asam); i) Al-P (pH basa)

Berdasarkan hasil perlakuan pada berbagai sumber P dan variasi pH (Gambar 4), didapatkan bahwa BPF hanya dapat membentuk holozone pada perlakuan sumber P dari Ca-P dan di pH tanah serta basa. Pada pH tanah, BPF membentuk holozone yang lebih luas dan bening. Hal tersebut diduga karena pada pH medium

agar yang digunakan sesuai dengan pH aslinya (pH tanah). Adapun perlakuan sumber P dari Al-P dan Fe-P tetap bisa tumbuh namun tidak membentuk holozone yang mengindikasikan bahwa BPF pada medium agar tersebut tidak memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat. Namun pada perlakuan b dan g, media agar

tidak dapat diinokulasikan BPF karena media yang terlalu masam sehingga sulit membeku. Ketidakterlibatan oksigen pada reaksi-reaksi di kondisi pH media yang rendah membuat media sulit untuk membeku (Aguilera & Toril, 2019).

Pengujian Patogenitas Isolat BPF

Isolat digoreskan pada *blood agar* dengan penambahan darah domba 5%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Terlihatnya *halozone* atau zona bening disekitar koloni setelah 18 jam inkubasi pada suhu 37°C, hal tersebut dianggap sebagai hasil positif produksi hemolisis. Media agar darah digunakan untuk mendeteksi kemampuan hemolisis bakteri. Daya lisis terhadap darah merupakan salah satu cara pengelompokan untuk melakukan uji biokimia lainnya, karena daya hemolisis adalah tes pendugaan terhadap suatu kelompok mikroorganisme yang selalu dihubungkan dengan kemampuan kuman menyebabkan infeksi (Osek, 2004).

Hasil uji patogenitas pada media *blood agar* menunjukkan bahwa 3 dari 9 isolat BPF berpotensi sebagai patogen. Hal tersebut diketahui dari adanya zona bening yang disebut sebagai α -hemolisis pada isolat 5P dan β -hemolisis pada isolat 2P dan 8P.

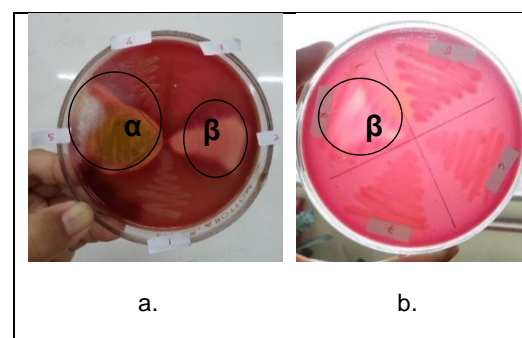
Tabel 4 Hasil Uji Patogenitas Blood Agar Isolat Bakteri Pelarut Fosfat

Nama Isolat	Uji Patogenitas	Uji Hemolisis
1P	Bukan Patogen	γ -hemolisis
2P	Patogen	β -hemolisis
3P	Bukan Patogen	γ -hemolisis
4P	Bukan Patogen	γ -hemolisis
5P	Patogen	α -hemolisis
6P	Bukan Patogen	γ -hemolisis
7P	Bukan Patogen	γ -hemolisis
8P	Patogen	β -hemolisis
9P	Bukan Patogen	γ -hemolisis

Buxton (2013), menyebutkan terdapat tiga jenis hemolisis yaitu beta (β)-hemolisis, alfa (α)-hemolisis, dan gamma (γ)-hemolisis. Beta hemolisis merupakan lisis lengkap sel darah merah dan hemoglobin, alfa hemolisis mengacu pada lisis parsial/lisis sebagian

dari sel darah merah dan hemoglobin, gamma hemolisis yaitu tidak terjadi hemolisis dimana tidak ada perubahan warna dalam media.

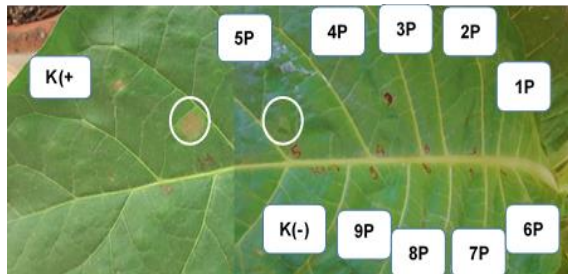
Menurut Amaria *et al.* (2019), proses hemolisis disebabkan oleh enzim yang dilepaskan oleh mikroorganisme yang diterima oleh *blood agar* sehingga terjadi reaksi untuk melisiskan butir darah merah tersebut. Kelompok bakteri yang sering dibedakan berdasarkan kemampuan melisiskan butir darah merah adalah *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. Produksi enterotoksin baik pada β -hemolisis maupun α -hemolisis dapat menentukan daya patogennya. Strain yang dimiliki β -hemolisis dapat lebih lama hidup dibandingkan dengan α -hemolisis (Hikmawati *et al.*, 2018).



Gambar 5 (a) Hemolisis *Blood Agar* Isolat 2P dan 5P (b) Hemolisis *Blood Agar* pada Isolat 8P

Uji hipersensitif dari 9 (sembilan) isolat BPF pada tanaman tembakau menunjukkan hanya 1 isolat (5P) yang menyebabkan nekrosis atau daun berubah warna menjadi kecoklatan. Daun yang berubah warna tersebut merupakan reaksi dari hipersensitivitas. Sebagai pembanding, pada daun yang sama disisipkan kontrol positif nekrosis dengan suspensi bakteri patogen *Pseudomonas sp.*, sedangkan kontrol negatif nekrosis disuntikkan akuades. Reaksi hipersensitif merupakan program kematian sel yang cepat dan terlokalisasi. Reaksi ini muncul pada tanaman yang terinfeksi saat terserang patogen dan hal tersebut merupakan upaya

dalam menghambat pertumbuhan patogen (Wahyudi *et al.*, 2011).



Gambar 6 (K+) Nekrosis Kontrol Positif, (K-) Nekrosis Kontrol Negatif, (5P) Nekrosis pada Isolat 5P

Berdasarkan hasil uji patogenitas pada tanaman tembakau, teruji 8 isolat BPF tidak menyebabkan nekrosis pada pengamatan hari ke-4. Jaringan daun tembakau yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri tersebut (8 isolat BPF) tetap terlihat sehat dan tidak menunjukkan adanya nekrosis (non-patogenik) pada tanaman tembakau kecuali isolat 5P. Suspensi bakteri akan berpotensi patogen untuk tanaman, apabila nekrosis terjadi pada titik yang disuntikkan (Schaad *et al.*, 2001).

KESIMPULAN

Isolat BPF berhasil diisolasi dari tegakan hutan maupun perkebunan singkong di area kampus IPB Dramaga Bogor. Berdasarkan beberapa uji dan seleksi menunjukkan bahwa 2 isolat BPF dari tegakan hutan (isolat 6P dan 7P) memiliki potensi terbesar dalam melarutkan P, dibuktikan dengan angka IPF yang tinggi (berturut-turut sebesar 3,10 dan 3,33). Adapun isolat BPF hanya dapat mengasilkan *halozone* atau zona bening pada media sumber P dari kompleks Ca-P dengan kondisi pH basa dan pH tanah. Dari 9 isolat terpilih, 6 diantaranya yaitu isolat 1P, 3P, 4P, 6P, 7P, dan 9P teruji bersifat non-patogen terhadap sel manusia, hewan, maupun tanaman.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada **Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Institut Pertanian Bogor dan seluruh dosen maupun civitas akademika di Laboratorium Bioteknologi Tanah IPB** dalam memberikan fasilitas dan bahan yang mendukung untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilera, A. and Toril, E. G. 2019.** Eukaryotic life in extreme environments: acidophilic fungi. *Ecological Role and Biotechnological Significance (Springer)*. 21-38.
- Amaria, W., Kasim, N.N., and Munif, A. 2019.** Kelimpahan populasi bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit tanaman kemiri sunan (*Reutealis trisperma* (blanco) Airy Shaw), serta potensinya sebagai agens biokontrol. *Journal TABARO*. 3(1):305–317.
- Babu, S. V., Triveni, S., Reddy, R. S., and Sathyanarayana, J. 2017.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganism form maize rhizosperic soils. *Bulletin of Environment, Pharmacology, and Life Sciences*. 6(1):194-200.
- Buxton, R. 2013.** Blood agar plates and hemolysis protocols. *Washington (US): American Society for Microbiology*.
- Danaatmadja, Y., Subandiyah, S., Joko, T., and Sari, C. U. 2009.** Isolasi dan Karakterisasi *Ralstonia syzygii*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 15(1):7-12.
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., Mazumdar, R. M., Chowdhury, A., and Hossain, M. N. 2013.** Identification and characterization of microorganism; DNA-fingerprinting methods. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 35(4):397-404.
- Hikmawati, F., Susilowati, A., and Setyaningsih, R. 2018.** Deteksi jumlah dan uji patogenitas *Vibrio*

- spp. pada kerang hijau (*Perna viridis*) di kawasan wisata Pantai Yogyakarta. *Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.*, 5(2):334-339.
- Mittal, V., Onkar, S., Harsh, N., Jagdeep, K., and Rupinder, T. 2008.** Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biol. Biochem.* 40:718-727.
- Novriani. 2010.** Alternatif pengelolaan unsur hara P (fosfor) pada tanaman budidaya jagung. *AgronobiS.* 2(3): 42-49.
- Osek, J. 2004.** Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from human cattle, and pigs. *Vet. Med-Czech.* 9:317-326.
- Pande, A., Prashant, P., Simmi, M., Mritunjay, S., and Suresh, K. 2017.** Phenotypic and genotypic characterization phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 15:379-391.
- Schaad, N.W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001.** Plant Pathogenic Bacteria 3rd . American Phytopathological Society. Minnesota.
- Sharon, Hathwaik, L.T., Glen, G. M., and Imam, S. H. 2016.** Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Juornal of Soil Science and Plant Nutrition.* 2(16): 525-536.
- Wahyudi, A.T., Meliah, S., and Nawangsih, A. A. 2011.** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: isolasi, karakterisasi, dan telaah mutagenesis dengan transposon. *Makara Sains.* 15:89-96.
- Widawati, S., and Suliasih. 2006.** Populasi bakteri pelarut fosfat (BPF) di Cikaniki, Gunung Botol dan Ciptarasa, serta kemampuannya dalam melarutkan P terikat di media pikovskaya padat. *Biodiversitas.* 7(2):160-167.