

**AKTIVITAS PELARUTAN FOSFAT ISOLAT *Azospirillum* spp.
ASAL LAHAN PASIR BESI**

**PHOSPHATE SOLUBILIZING ACTIVITIES *Azospirillum* spp. ISOLATES
FROM IRON SAND LAND**

Sodik Wuryanto¹⁾, Dr. Oedjijono, M.Sc.,²⁾ Dr.rer.nat Sarjiya Antonius³⁾

^{1),2)}Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

³⁾Pusat Penelitian Biologi, Bidang Mikrobiologi LIPI Cibinong

Email: ¹⁾sodik.wuryanto@gmail.com, ²⁾oedjijono@gmail.com, ³⁾sarj.antonius@gmail.com

ABSTRACT

Iron sand lands have a low organic matter content as it contains of Iron (Fe) found nearly all over the coastal or beach in Indonesia. Phosphorous is one of macronutrient with considered role for plant promotion. One group of bacteria that are in an environment of rooting plants on land sand iron was *Azospirillum* spp. The purpose of this study was is to know the phosphate solubilizing activities of *Azospirillum* spp. isolates from land sand iron. The results showed that some isolates of *Azospirillum* spp. origin of iron sand land capable of solubilizing phosphate in qualitative and quantitative.

Key words: *Azospirillum* spp., phosphate, solubilization, iron sand

PENDAHULUAN

Lahan pasir besi ditemukan hampir di seluruh pesisir di Indonesia. Karakteristik pasir besi ini didominasi oleh tekstur berpasir, memiliki kandungan besi (Fe) sebesar 38-59%, berwarna kehitaman pada kondisi alamnya, dan memiliki kandungan bahan organik yang rendah. Rendahnya bahan organik ini berpengaruh pada terbatasnya jenis tumbuhan di lahan pasir besi. Beberapa kelompok mikroorganisme khususnya bakteri perakaran umumnya berasosiasi dengan tumbuhan dan dapat membantu tumbuhan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi bagi pertumbuhannya di lahan pasir besi.

Fosfor (P) merupakan salah satu makronutrien yang dibutuhkan bagi tanaman. Ketersediaan P menjadi sangat penting bagi tanaman karena berkaitan erat dengan perkembangan akar, pembentukan biji, dan meningkatkan resistensi dari penyakit.

Keberadaannya yang terbatas di tanah menjadi hambatan dalam pemanfaatannya oleh tanaman secara langsung. Bakteri pelarut fosfat memiliki peranan penting dalam menyediakan unsur P bagi tanaman melalui mekanisme pelarutan fosfat dari pengkelatnya seperti Ca^{2+} , Al^{3+} , dan Fe^{3+} (Khan et al., 2009). Kemampuan pelarutan P oleh mikroba merupakan salah satu aktivitas penting yang dibutuhkan bagi tumbuhan berkaitan dengan pemenuhan kebutuhan P bagi tumbuhan (Glick, 1995).

Azospirillum spp. merupakan bakteri Gram negatif yang hidup bebas di tanah dan mampu menambat nitrogen bebas dalam keadaan mikroaerofilik. Isolat *Azospirillum* spp. asal rizosfer dan tanah pasir besi memiliki kemampuan untuk menambat nitrogen dengan kisaran 5,73-95,54 ppm dengan menggunakan metode *Kjeldahl* (Oedjijono et al., 2014).

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas pelarutan fosfat isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi secara kualitatif dan kuantitatif.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian dilakukan dengan metode deskriptif komparatif dengan membandingkan kemampuan pelarutan fosfat secara kualitatif dan kuantitatif dari masing-masing isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi. Isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi merupakan koleksi kultur milik Oedjijono (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UNSOED) Isolat yang terpilih pada penelitian kali ini merupakan koleksi kultur isolat yang memiliki kemampuan penambatan N₂ bebas yang berkisar antara 35-55 ppm berdasarkan pengukuran menggunakan metode *Kjeldahl*.

Subkultur isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi

Sebanyak satu kultur stok *Azospirillum* spp. ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* (*Beef extract* 3 g, *Peptone* 5 g, dan *Agar* 15 g) dengan cara digoreskan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Uji Kemampuan Pelarutan Fosfat Isolat *Azospirillum* spp. asal rizosfer lahan pasir besi secara kualitatif

Sebanyak satu ose kultur padat isolat *Azospirillum* spp. diinokulasikan secara aseptis dengan metode *spot inoculation* pada cawan Petri berisi medium *Pikovskaya Agar* (Pikovskaya, 1948). Inokulasi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan pada tiap cawan. Cawan yang telah diinokulasi kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 7

hari. Zona jernih yang muncul di sekitar koloni yang tumbuh diukur diameternya. Kemampuan pelarutan fosfat (IP) diukur berdasarkan rumus :

$$IP = \frac{\text{Diameter pelarutan}}{\text{Diameter koloni}} \times 100$$

Uji Kemampuan Pelarutan Fosfat Isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi secara kuantitatif (Ahmad *et al.*, 2008)

Satu kultur ose diinokulasikan pada NaCl fisiologis cair dan diukur hingga kepadatannya seragam. Sebanyak 4% inokulum dengan kepadatan yang seragam (OD₆₀₀ = 0,600-0,650) isolat *Azospirillum* spp. diinokulasikan pada 50 ml medium *Pikovskaya Broth* dalam *Erlenmeyer* 100 ml. Inkubasi pada *shaker orbital* pada kecepatan 150 rpm selama 7 hari. Untuk perlakuan kontrol diinokulasikan dengan NaCl fisiologis 0,9% steril. Setelah 7 hari inkubasi, kultur diambil, untuk pengukuran fosfat anorganik terlarut, sebanyak 10 ml kemudian disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no. 41 untuk memisahkan sisa Ca₃(PO₄)₂. Hasil saringan kemudian disentrifus pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan dalam labu takar 50 ml kemudian ditambahkan dengan 10 ml reagen *Chloromolybdic acid* dikocok hingga homogen kemudian ditambahkan dengan 100 µl reagen *Chlorostannous* dikocok hingga homogen kemudian ditambahkan dengan akuades hingga mencapai volume 50 ml. Larutan ditunggu selama 10 menit kemudian ukur absorbansi sampel pada panjang gelombang 600 nm. Absorbansi kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi linier kurva standar fosfat (KH₂PO₄) sehingga akan

didapatkan jumlah fosfat anorganik terlarut (mg/L).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keanekaragaman *Azospirillum* spp. di rizosfer dan tanah pasir besi sudah mulai diteliti. Oedjijono *et al.* (2014) berhasil mengisolasi beberapa isolat *Azospirillum* spp. yang diduga memiliki peran dalam membantu pertumbuhan tanaman di habitat tanah pasir besi. Isolat ini kemungkinan memiliki potensi sebagai kandidat isolat PGPR khususnya bagi tanaman apabila diaplikasikan pada lahan marjinal. Kemampuan secara *in vitro* dalam menambat nitrogen, produksi IAA, dan melarutkan fosfat adalah beberapa potensi yang di antaranya dimiliki oleh isolat *Azospirillum* spp. asal rizosfer dan tanah pasir besi.

Pengujian aktivitas pelarutan fosfat isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi dari beberapa isolat menunjukkan hasil yang bervariasi. Hasil pengamatan kemampuan pelarutan fosfat isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi baik secara kualitatif dengan mengamati terbentuknya *halozone* di sekitar koloni pada medium *Pikovskaya* Agar untuk menentukan indeks pelarutan fosfat ataupun kuantitatif melalui pengukuran estimasi fosfat anorganik dapat dilihat pada tabel 4.1. Terlihat bahwa seluruh isolat *Azospirillum* spp. asal rizosfer lahan pasir besi pada penelitian ini memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat secara kualitatif melalui pengukuran indeks pelarutan (IP) maupun secara kuantitatif melalui pengukuran estimasi fosfat anorganik didapatkan hasil yang serupa.

Tabel 4.1. Kemampuan isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi dalam melarutkan fosfat secara kualitatif dan kuantitatif

| Kemampuan Pelarutan Fosfat | | |
|----------------------------|--------------------|------------------------|
| Kode Isolat | Uji Kualitatif (%) | Uji Kuantitatif (mg/l) |
| HR154 | 118,63 ± 1,75 | 374,00 ± 55,07 |
| KR33 | 135,38 ± 5,26 | 270,33 ± 70,47 |
| HR92 | 122,10 ± 10,15 | 327,00 ± 90,44 |
| HR141 | 123,67 ± 10,15 | 377,00 ± 89,72 |
| HR124 | 110,15 ± 5,13 | 302,33 ± 57,73 |
| HR152 | 116,36 ± 1,79 | 310,67 ± 8,08 |

Aktivitas pelarutan fosfat tertinggi melalui pengamatan pada medium *Pikovskaya* Agar melalui pengamatan *halozone* di sekitar koloni ditunjukkan oleh isolat *Azospirillum* sp. KR33 dengan indeks pelarutan fosfat (IP) mencapai $135,38 \pm 5,26$, disusul dengan isolat *Azospirillum* sp. HR141 ($123,67 \pm 10,15$), HR92 ($122,10 \pm 10,15$), HR154 ($118,63 \pm 1,75$), HR152 ($116,36 \pm 1,79$), sedangkan aktivitas kualitatif pelarutan fosfat

terendah dimiliki oleh isolat *Azospirillum* sp. HR124 dengan nilai IP $110,15 \pm 5,13$. Oedjijono *et al.* (2014) menyatakan bahwa efisiensi pelarutan fosfat *Azospirillum* sp. asal lahan pasir besi berkisar antara 100 sampai 140.

Pengukuran kuantitatif aktivitas pelarutan fosfat dilakukan dengan metode kolorimetri untuk mengamati estimasi fosfat anorganik terlarut yang menunjukkan kandungan fosfat terlarut yang

terdapat pada medium. Aktivitas pelarutan fosfat tertinggi secara kuantitatif dimiliki oleh isolat *Azospirillum* sp. HR141 dengan jumlah fosfat anorganik terlarut mencapai $377 \pm 89,72$ mg/L, disusul dengan isolat *Azospirillum* sp. HR154 ($374 \pm 55,07$ mg/L), HR92 ($327 \pm 90,44$ mg/L), HR152 ($310,67 \pm 8,08$ mg/L), HR124 ($302,33 \pm 57,73$ mg/L) sedangkan isolat yang memiliki jumlah fosfat anorganik terlarut adalah isolat KR33 sebesar $270,33 \pm 70,47$ mg/L.

Menurut Chen *et al.* (2006), aktivitas pelarutan fosfat salah satunya dipengaruhi oleh kemampuan bakteri pelarut fosfat dalam menghasilkan asam organik yang memiliki peranan dalam melarutkan ion Ca sehingga menjadi bentuk terpisah dari fosfat melalui gugus karboksil dan hidroksil yang dimiliki oleh asam organik tersebut. Meskipun begitu, asam organik bukanlah mekanisme utama dari bakteri pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat karena pelarutan fosfat adalah fenomena yang kompleks dan melibatkan banyak faktor seperti nutrisi, fisiologi, dan kondisi kultur.

Rodriguez dan Fraga (1999) menyatakan bahwa isolat *A. brasilense* dan *A. lipoferum* memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa asam organik seperti asam glukonat (*gluconic acid*). Medium dengan sumber gula fruktosa mampu menstimulus *A. brasilense* untuk menghasilkan glukonat dan menyerap NH_4^+ yang nantinya akan melepaskan ion H^+ ke dalam medium sehingga akan menurunkan derajat keasaman dari medium tersebut dan membuat fosfat anorganik menjadi larut.

Mekanisme utama pelarutan fosfat inorganik oleh bakteri

umumnya melalui mineralisasi dan imobilisasi.

Kemampuan mengeluarkan komponen kimia kompleks seperti asam organik dan melepaskan fosfor selama degradasi substrat (Sharma *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan tersebut di atas maka dapat diambil simpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut isolat *Azospirillum* spp. asal lahan pasir besi mampu melarutkan fosfat secara kualitatif dan kuantitatif

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada Proyek DIPA PN LIPI 2014-2015 di bawah koordinasi Dr. Sarjiya Antonius dan Disertasi Dr. Oedjiono M.Sc yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR REFERENSI

- Ahmad, F. Iqbal A., M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163: 173-181.
- Chen, Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W. A. Lai, C.C. Young. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 4: 109-117.

- Khan, A.A. G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. S. Navqi, M. Rasheed. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria : Occurrence, Mechanisms, and Their Role in Crop Production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1(1): 48-58.
- Oedjijono, E. S. Soetarto, Sukarti Moeljopawiro, and H. A. Djatmiko. 2014. Promising Plant Growth Promoting Rhizobacteria of *Azospirillum* spp. Isolated from Iron Sand Soils, Purworejo Coast, Central Java, Indonesia. *Advances in Applied Science Research* 5 (3): 302-308.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- Rodriguez, H. Fraga R. 1999. Phosphate Solubilizing Bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17: 319-339.
- Sharma, B.S. R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi, T. A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes : sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Review SpringerPlus* 2: 587-602.