

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI RIZOBAKTERI UBI JALAR CILEMBU (*IPOMOEA BATATAS* VAR. CILEMBU) YANG BERPOTENSI SEBAGAI PELARUT FOSFAT

Agustina Monalisa Tangapo<sup>1\*</sup>, Susan Mambu<sup>2</sup>, Johanis Pelealu<sup>3</sup>  
<sup>1,2,3</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sam Ratulangi, Manado

agustina.tangapo@unsrat.ac.id

Pemanfaatan rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman sebagai pupuk hayati merupakan salah satu pendekatan dalam budidaya komoditas-komoditas bernilai ekonomi tinggi yang berorientasi pada sistem pertanian yang berkelanjutan dan ramah lingkungan. Salah satunya dengan pemanfaatan bakteri yang mampu melarutkan fosfat sehingga dapat diserap oleh tanaman. Aktivitas mikroba indigen yang ada di sekitar perakaran tanaman berpengaruh langsung terhadap ketersediaan fosfat di dalam tanah. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi rizobakteri ubi jalar cilembu, menguji kemampuan bakteri dalam pelarutan fosfat, dan karakterisasi secara mikrobiologi terhadap isolat potensial. Isolasi dilakukan dengan metode cawan sebar, aktivitas pelarutan fosfat diuji secara kualitatif menggunakan media Pikovskaya dan mengukur indeks pelarutan fosfat, dan karakterisasi isolat secara makroskopis, mikroskopis dan biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 17 isolat berpotensi melarutkan fosfat pada media Pikovskaya dengan indeks solubilisasi berkisar 1,07 – 1,52. Kelompok bakteri Gram Positif menunjukkan rata-rata rasio solubilisasi tertinggi.

*Kata kunci: rizobakteri, ubi cilembu, pelarut fosfat, pikovskaya, pemacu pertumbuhan tanaman*

### ABSTRACT

*The utilization of plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizer is one approach in the cultivation of high-value commodities oriented towards sustainable and environmentally friendly agricultural systems. One of them is by utilizing bacteria that are able to dissolve phosphate so that it can be absorbed by plants. Indigenous microbial activities around plant roots directly affect the availability of phosphate in the soil. This study aims to isolate cilembu sweet potato rhizobacteria, test the ability of bacteria in phosphate dissolution, and microbiological characterization of potential isolates. Isolation was carried out by the scatter plate method, phosphate dissolving activity was tested qualitatively using Pikovskaya media and measuring the phosphate dissolving index, and characterization of isolates macroscopically, microscopically and biochemically. The results showed that 17 isolates had the potential to dissolve phosphate on Pikovskaya media with a solubilization index ranging from 1.07 - 1.52. Gram-positive bacteria group showed the highest average solubilization ratio.*

*Keywords: rhizobacteria, cilembu sweet potato, phosphate solubilization, Pikovskaya, plant-growth promoting*

### PENDAHULUAN

Pemanfaatan kelompok bakteri pelarut fosfat merupakan salah satu pendekatan dalam meningkatkan efisiensi pemupukan fosfat untuk menyediakan fosfat dalam bentuk tersedia sehingga dapat diserap oleh tanaman. Pemanfaatan inokulan berbahan aktif organisme hidup yang berfungsi untuk menyediakan nutrisi dalam bentuk yang tersedia bagi tanaman merujuk pada pupuk hayati. Eksplorasi mikroorganisme dalam pupuk hayati terus berkembang. Aplikasi pupuk hayati merupakan salah satu pendekatan yang diterapkan untuk mengatasi dampak negatif terhadap kesuburan tanah akibat penggunaan pupuk sintetis dalam jangka waktu yang lama.

Fosfor (P) merupakan unsur esensial kedua setelah N bagi pertumbuhan dan perkembangan biologis. Fosfor pada tanah banyak tersedia dalam keadaan tidak larut, yang tidak dapat segera digunakan oleh tanaman. Sejumlah bakteri rhizosfer yang memiliki kemampuan untuk menyediakan P dalam bentuk yang dapat digunakan oleh tanaman dikenal sebagai bakteri pelarut fosfat (Bhattacharyya dan Jha, 2012).

Bakteri dapat secara langsung meningkatkan ketersediaan unsur P bagi tanaman melalui solubilisasi dan mineralisasi, yang melibatkan enzim fosfatase. Selain dapat menghasilkan enzim, bakteri pelarut fosfat juga dapat mengeluarkan asam-asam organik atau proton; serta pengkelatan dan reaksi pertukaran. Bakteri pelarut fosfat merupakan bakteri yang mampu tumbuh pada substrat yang mengandung trikalsium, besi dan aluminium fosfat, hidroksipatit, fosfat bebatuan dan senyawa fosfat tak larut lainnya yang mirip, sebagai sumber P (Alori dkk., 2017).

Kehadiran bakteri pelarut fosfat sangat beragam antara satu daerah dengan daerah lainnya. Variasi tersebut disebabkan sifat-sifat khusus mikroba dan kondisi lingkungan optimal yang berbeda-beda antara satu dengan yang lainnya sehingga mempengaruhi kemampuan melarutkan fosfat. Ubi jalar cilembu merupakan salah satu varietas unggul ubi jalar yang spesifik lokasi. Varietas ubi jalar ini menjadi salah satu kekayaan genetik di Indonesia. Cilembu merupakan desa yang terdapat di Kecamatan Pamulihan Kabupaten Sumedang Jawa Barat. Berdasarkan observasi di lapangan, upaya ekstensifikasi tanaman ini di luar daerah asalnya mengalami kendala karena menghasilkan kualitas ubi yang berbeda dengan daerah asalnya. Selain faktor genetika, kondisi tanah juga ikut mempengaruhi. Padahal, permintaan ekspor komoditas ini cukup tinggi. Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengisolasi bakteri rhizosfer dari ubi jalar varietas cilembu yang mampu melarutkan fosfat. Isolat-isolat bakteri pelarut fosfat tersebut diharapkan dapat menjadi kandidat pupuk hayati yang dapat diterapkan dalam budidaya ubi cilembu di luar daerah asalnya.

## **METODE PENELITIAN**

### **Isolasi Bakteri**

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode cawan-sebar (*spread plate method*) dengan teknik pengenceran serial (Cappuccino dan Sherman, 2005). Sampel tanah rhizosfer yang diambil dari lahan perkebunan ubi cilembu di Desa Cilembu Jawa Barat sebanyak 10 g dilarutkan dalam 90 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS), kemudian dilakukan pengenceran berseri dan disebarkan secara merata menggunakan batang kaca L di media *Tryptic Soy Agar* (TSA). Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 24–72 jam dengan tiga kali ulangan (Kumar dkk., 2012; Marques dkk., 2014).

### **Uji kemampuan sebagai pelarut fosfat**

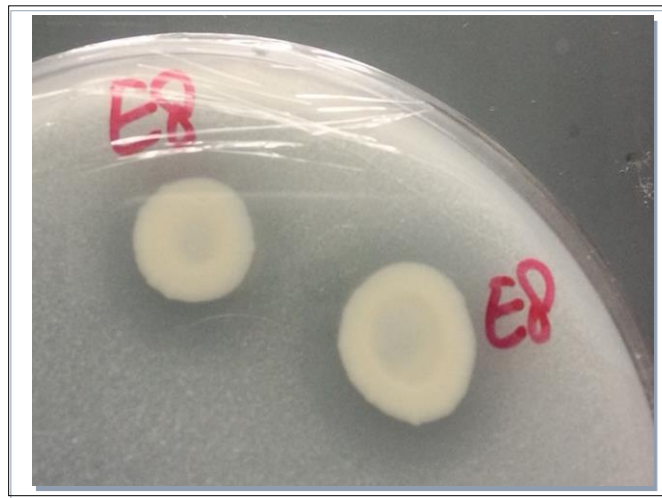
Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media Pikovskaya dengan penambahan tri-kalsium fosfat sebagai sumber fosfat, diinkubasi pada suhu  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  selama 7 hari. Pengamatan dilakukan terhadap terbentuknya zona bening di sekitar koloni sebagai zona solubilisasi. Indeks solubilisasi dihitung berdasarkan rasio diameter zona solubilisasi / diameter koloni (Nguyen dkk. 1992).

### **Karakterisasi Isolat**

Pengamatan karakteristik makroskopis meliputi bentuk, tepian, elevasi, pigmentasi, dan sifat optis. Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk pengamatan bentuk sel dan pewarnaan Gram. Uji biokimia yang dilakukan terdiri atas hidrolisis pati, hidrolisis kasein, hidrolisis gelatin, hidrolisis lemak, fermentasi glukosa, fermentasi sukrosa, fermentasi laktosa, reduksi nitrat, uji metil merah, uji Voges-Proskauer, uji Simmons's sitrat, produksi H<sub>2</sub>S, produksi indol, produksi urease, produksi katalase dan oksidase (Cappuccino dan Sherman, 2005). Data yang didapatkan kemudian dirujuk ke *Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9 (Holt dkk., 1994).

## HASIL

Hasil isolasi bakteri dari rhizosfer ubi cilembu memperoleh 40 jenis isolat yang selanjutnya diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat secara *in vitro*. Analisis kemampuan melarutkan fosfat dilakukan berdasarkan pembentukan daerah bening pada medium Pikovskaya (Gambar 1) yang mengindikasikan adanya aktivitas melarutkan P terikat dalam bentuk tri kalsium fosfat. Efisiensi solubilisasi fosfat diukur berdasarkan indeks solubilisasi yaitu rasio diameter zona solubilisasi terhadap diameter koloni bakteri. Hasil uji bakteri rhizosfer ubi cilembu menunjukkan 42,5% (17 isolat) dari total isolat yang diperoleh yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat. Indeks solubilisasi atau rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni berkisar antara 1,07–1,52 (Tabel 1).



Gambar 1. Pembentukan daerah bening pada medium Pikovskaya di sekitar isolat.

Tabel 1. Indeks solubilisasi isolat bakteri rhizosfer ubi cilembu

No.	Isolat	Indeks Solubilisasi P	No	Isolat	Indeks Solubilisasi P
1	BR1	1,17 <sup>b</sup>	21	BR19T	-
2	BR2	1,13 <sup>b</sup>	22	BR20	-
3	BR3	1,10 <sup>b</sup>	23	BR21	-
4	BR4	1,22 <sup>b</sup>	24	BR22	-
5	BR5	1,34 <sup>a</sup>	25	BR23	-
6	BR6	-	26	BR24A	-
7	BR7	-	27	BR24B	1,22 <sup>b</sup>
8	BR8	1,40 <sup>a</sup>	28	BR24C	-
9	BR9	1,37 <sup>a</sup>	29	BR25	-
10	BR10	-	30	BR26	0,74 <sup>c</sup>
11	BR11	1,33 <sup>a</sup>	31	BR27	-
12	BR12	-	32	BR6B	1,19 <sup>b</sup>
13	BR13A	1,20 <sup>b</sup>	33	BR29	-
14	BR13B	1,29 <sup>b</sup>	34	BR30	-
15	BR14	1,52 <sup>a</sup>	35	BR31	1,14 <sup>b</sup>
16	BR15	-	36	BR32	-
17	BR16	-	37	BR33	-
18	BR17	-	38	BR34	1,38 <sup>a</sup>
19	BR18	1,25 <sup>b</sup>	39	BR37	-
20	BR19P	-	40	BR38	-

Uji biokimia dilakukan untuk mengarakterisasi semua isolat bakteri pelarut fosfat yang diperoleh dalam proses isolasi. Pengamatan dengan melihat proses biokimia bakteri dilakukan dengan beberapa uji yaitu hidrolisis pati, kasein dan gelatin, fermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa, produksi indol, TSIA, motilitas, katalase, dan urease. Hasil karakterisasi secara biokimia dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Karakterisasi isolat pelarut fosfat**

Characteristics	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	BR8	BR9	BR11	BR13A	BR13B
Colony										
<b>Shape</b>	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
<b>Elevation</b>	Convex	Convex	Raised	Convex	Convex	Convex	Raised	Convex	Convex	Convex
<b>Margin</b>	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Lobate	Undulate
<b>Pigmentation</b>	Opaque -white	Translucent -white	Transparent -white/pale brownish	Opaque -oranye	Opaque -yellow	Opaque -yellow	Opaque -yellow	Opaque -yellow	Opaque -white	Opaque -white
Morphological										
<b>Gram staining</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<b>Cell shape</b>	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Biochemical										
Hydrolysis of										
<b>Starch</b>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<b>Lipid</b>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<b>Casein</b>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<b>Gelatin</b>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Production of acid from										
<b>Glucose</b>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sucrose</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Lactose</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Indole production</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Methyl red test</b>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<b>Voges Proskauer test</b>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Citrate utilization</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nitrate reduction</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>H<sub>2</sub>S production</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Urease test</b>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Catalase test</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<b>Oxidase test</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Characteristics	BR14	BR18	BR24B	BR26	BR6B	BR31	BR34
Colony							
<b>Shape</b>	Circular	Circular	Filamentous	Circular	Circular	Circular	Circular
<b>Elevation</b>	Flat	Crateriform	Raised	Undulate	Convex	Convex	Flat
<b>Margin</b>	Entire	Undulate	Filiform	Umbonate	Entire	Smooth	Entire
<b>Pigmentation</b>	Opaque -white	Opaque- White	Opaque -white	Opaque -white	Yellow	Opaque -white	Opaque -white
Morphological							
<b>Gram staining</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Cell shape</b>	Rod	Filament	Rod	Rod	Coccus	Rod	Rod
Biochemical							
Hydrolysis of							
<b>Starch</b>	+	+	+	+	-	-	+
<b>Lipid</b>	+	-	+	-	-	+	-
<b>Casein</b>	+	+	+	-	-	-	+
<b>Gelatin</b>	+	-	+	+	-	+	+
Production of acid from							
<b>Glucose</b>	+	-	+	+	-	+	+
<b>Sucrose</b>	+	-	-	-	-	-	+
<b>Lactose</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Indole production</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Methyl red test</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Voges Proskauer test</b>	-	-	-	-	+	+	-
<b>Citrate utilization</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nitrate reduction</b>	+	-	-	+	-	-	+
<b>H<sub>2</sub>S production</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Urease test</b>	-	+	-	-	-	-	-
<b>Catalase test</b>	+	+	-	-	+	+	+
<b>Oxidase test</b>	-	-	-	-	-	-	-

Berdasarkan indeks solubilisasi fosfat pada bakteri pelarut fosfat (Tabel 1), isolat BR14 memiliki indeks solubilisasi fosfat tertinggi yaitu sebesar 1,53. Hasil karakterisasi makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia dari isolat BR14 menunjukkan ciri bakteri *Bacillus*. Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki aktivitas enzim fosfatase dan/atau menghasilkan asam-asam organik yang dibutuhkan dalam mekanisme pelarutan fosfat. Dari 17 isolat yang potensial sebagai pelarut fosfat, 10 isolat merupakan kelompok bakteri Gram Positif.

## PEMBAHASAN

Fosfor (P) merupakan salah satu makronutrien esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman dan terdapat sekitar 400–1200 mg/kg dari tanah. Di tanah, unsur P terdapat dalam dua bentuk yaitu fosfat organik dan inorganik. Bakteri dapat mengubah fosfat tidak terlarut (organik dan inorganik) menjadi bentuk yang dapat diserap oleh tanaman. Hanya 0,1% dari P total dalam bentuk yang tersedia bagi tanaman, yaitu dalam bentuk ion *monobasic* ( $H_2PO_4^-$ ) dan *diabasic* ( $HPO_4^{2-}$ ) (Glass, 1989). Pada penelitian ini diperoleh 17 isolat bakteri yang berasosiasi dengan rhizosfer ubi

cilembu yang memiliki kemampuan sebagai pelarut fosfat dengan menggunakan substrat media tri-kalsium fosfat pada medium Pikovskaya. Bakteri pelarut fosfat yang tumbuh pada media Pikovskaya membentuk daerah bening di sekeliling isolatnya. Daerah bening yang terbentuk menunjukkan adanya pelarutan fosfat dari sumber fosfat sukar larut yang terkandung dalam medium oleh asam-asam organik yang dihasilkan oleh isolat-isolat tersebut. Bakteri dapat mensolubilisasi tri-kalsium fosfat umumnya melalui mekanisme asidifikasi medium dengan biosintesis dan pelepasan berbagai macam asam organik (Bhattacharyya dan Jha, 2012).

Karakterisasi secara biokimia yaitu dengan melihat proses metabolisme bakteri baik secara ekstraseluler maupun secara intraseluler. Hasil identifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia menunjukkan bahwa isolat BR14 yang teridentifikasi sebagai genus *Bacillus*. Genus *Bacillus* memiliki sel berbentuk batang, bakteri Gram Positif, motil, dan berukuran 0,5-2,5 x 1,2-10 µm. *Bacillus* sp. termasuk bakteri yang banyak ditemukan di daerah rhizosfer dan memiliki kemampuan memacu pertumbuhan tanaman. Menurut Sturz dan Nowak (2000), bakteri yang paling efisien sebagai pelarut fosfat adalah genus *Bacillus* dan *Pseudomonas*. Selain kedua genus tersebut, bakteri lain yang juga memiliki kemampuan sebagai pelarut fosfat adalah *Escherichia*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Sarcina* dan *Xanthomonas*.

Substrat organik yang terdapat di dalam tanah dapat menjadi sumber P bagi pertumbuhan tanaman dan harus dihidrolisis menjadi P inorganik. Mineralisasi senyawa organik yang mengandung fosfor tersebut melibatkan enzim-enzim seperti fosfatase (fosfohidrolase), phytase, phosphonoacetate hydrolase, D- $\alpha$ -glycerophosphatase, dan C-P lyase. Mekanisme solubilisasi fosfat baik oleh tanaman maupun bakteri dengan menghasilkan asam organik yang secara langsung dapat melarutkan fosfat mineral sebagai hasil dari *anion exchange*  $PO_4^{2-}$  oleh anion asam atau dapat melalui pengkelatan ion-ion dari besi dan aluminium yang sering berasosiasi dengan fosfat (Alori dkk., 2017). Pemanfaatan bakteri pelarut fosfat sebagai pupuk hayati dapat diterapkan dengan cara menginokulasi secara langsung pada tanaman benih atau biji, atau seperti pemupukan biasanya.

## **KESIMPULAN**

Sebanyak 17 jenis isolat yang diperoleh dari isolasi sampel tanah rhizosfer ubi jalar cilembu memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat dengan indeks solubilisasi berkisar 1,07 – 1,52. Kelompok bakteri Gram Positif menunjukkan rata-rata rasio solubilisasi tertinggi. Isolat BR14 yang teridentifikasi sebagai genus *Bacillus* memiliki indeks solubilisasi tertinggi yaitu 1,52.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.* 8:971. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Cappuccino JG, Sherman N. 2005. *Microbiology: A laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Benjamin Cummings Publishing Company, New York, NY, USA.
- Glass ADM. 1989. *Plant nutrition. An introduction to current concepts*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed., Baltimore, Williams and Wilkins.
- Kumar G, Kanaujia N, Bafana A. 2012. Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra valley. *Microbiological Research.* 167: 220 – 225.

- Marques JM, da Silva TF, Vollu RE, Blank AF, Ding G, Seldin L, Smalla K. 2014. Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 88: 424 – 435.
- Nguyen C, Yan W, Le Tacon F, Lapeyrie F. 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant and Soil*. 143:193 – 199.
- Sturz AV, Nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*. 15:183 – 190.