

VALIDASI BAKTERI PELARUT FOSFAT INDIGENUS MADURA PADA RHIZOSFER

Gita Pawana

Prodi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura

Koresponden: gitapawana@yahoo.co.id

ABSTRACT

Often generalized that the determination effectiveness of biological agents depends on environment. The purpose of this study is to obtain an explanation of the role of growth limiting factors, chemical or physical on the effectiveness Madura indigenous *Pseudomonas aeruginosa* as a phosphate solubilizing. The method used in achieving the goal of research is, perform *in vitro* studies on the type of carbon source (sugar) and the level of salinity as the growth limiting factors of bacteria on the effectiveness of phosphate dissolution and study the influence of the the rice rhizosphere type of phosphate available. Found that *in vitro*, the type of carbon source

PENDAHULUAN

Peningkatan konsentrasi dan jenis asam organik (asam karboksilat) serta aktifitas enzim fosfatase yang diekskresikan mikroba pelarut fosfat merupakan mekanisme pelarutan fosfat. Konsentrasi dan jenis asam organik serta enzim fosfatase merupakan rangkaian akibat pertumbuhan bakteri pelarut fosfat. Berdasarkan uraian ini dapat dijelaskan bahwa efektivitas pelarutan fosfat oleh bakteri pelarut fosfat di dalam rhizosfer pada dasarnya merupakan dampak dari pertumbuhan bakteri pelarut fosfat yang ada di dalam rhizosfer (Vega, 2007; Fankem *et al.*, 2009)

Secara *in vitro* ditunjukkan dengan turunnya pH atau meningkatnya $[H^+]$ diikuti dengan meningkatnya konsentrasi fosfat terlarut pada media kultur. Proton (H^+) yang berasal dari asam organik akan mengikat anion fosfat, gugus hidroksil dan karboksilnya mengkelat (ikatan) kation fosfat, namun juga dinyatakan bahwa tingkat kelarutan fosfat tidak selalu proporsional terhadap penurunan pH artinya dengan pH akhir yang lebih rendah belum tentu diperoleh pelarutan fosfat yang lebih banyak (Bagyaraj *et al.*, (2000); Khan *et al.*, (2009). Sebaliknya pada rhizosfer (dimana kondisi pH tanah selalu tersangga) anion dari

and salinity levels affect phosphate concentrations and abundance of bacterial cells. Increased levels of salinity decreases the abundance of bacterial cells. Average cell population fluorescent pseudomonads in fields rice rhizosphere is higher than the lowland rice rhizosphere, the cell population fluorescent pseudomonads higher level provide higher available phosphate and vegetative growth of rice better.

Key words: Phosphate solubilizing, limiting growth, carbon source, salinity, the rhizosphere Madura indigenous.

asam organik bisa ditemukan pada kompleks jerapan menggantikan kedudukan fosfat, selain itu juga ditemukan mengkelat kation Fe dan Al. Dengan demikian pada kondisi pH tersangga anion dari asam organik lebih berperan dalam memobilisasi fosfat dari pada ion H^+ . Secara *in vitro* ditunjukkan dengan perbedaan jenis asam organik yang diekskresikan bakteri pelarut fosfat memberikan perbedaan tingkat kelarutan fosfat (Vega, 2007; Fankem *et al.*, 2008).

Adapun pelarutan ortofosfat dari fosfat organik merupakan proses enzimatik, mineralisasi fosfat organik dengan kuat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, sifat fisikokimia dan biokimia molekul fosfatnya organiknya, seperti asam nukleat, fosfolipid, gula fosfat. Enzim fosfatase diekskresikan keluar membran plasma, dilepaskan dalam bentuk larutan atau ditahan sebagai protein yg terikat membran, dan berperan sebagai enzim pencari senyawa fosfoester organik (Rodriguez dan Fraga, 1999; Khan *et al.*, 2009).

Kemampuan menggunakan senyawa gula dan kondisi salinitas merupakan faktor pembatas pertumbuhan bakteri, hal ini dikarenakan gula sebagai sumber energi dan sumber karbon merupakan penggerak biosintesis selluler dan salinitas menentukan

rentang osmolaritas terhadap permeabilitas membran sel. Demikian juga dengan rhizosfer akan membatasi pertumbuhan bakteri aerobik akibat konsentrasi oksigen yang dikandungnya. Brimecombe *et al.* (2001) menjelaskan bahwa pada rhizosfer tersedia beragam senyawa gula, yang berasal dari eksudat akar tanaman, namun demikian Atlas (2004) menjelaskan bahwa kemampuan bakteri menggunakan jenis senyawa gula sebagai sumber energi dan sumber karbon ditentukan oleh jenis spesies bakterinya. Terkait dengan kondisi rhizosfer ditunjukkan oleh Pawana *et al.* (2010), bahwa pada rhizosfer yang berbeda terdapat perbedaan efektivitas pelarutan fosfat oleh *Pseudomonas aeruginosa* indigenus Madura.

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji pengaruh jenis gula, dan salinitas media kultur, terhadap fosfat terlarut, kelimpahan sel bakteri pelarut fosfat, dan pengaruh jenis rhizosfer (padi sawah dan ladang) terhadap populasi sel dan fosfat tersedia pada rhizosfer, serta pertumbuhan vegetatif tanaman.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, bakteri pelarut fosfat *Pseudomonas aeruginosa* indigenus Madura koleksi jurusan Agroekoteknologi Universitas Trunojoyo, benih padi varietas IR 64, aquadest, glukosa, sukrosa, fruktosa, maltosa, NaCl, media *nutrien agar*, media *Pikovskaya*, media King's B, pupuk ZA, SP 36, KCl. Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas, Quebec colony counter, timbangan analistis spektrofotometer.

Peran Faktor Pembatas Pertumbuhan Bakteri Dalam Pelarutan Fosfat

Digunakan perlakuan faktor ke 1 jenis gula (g) yang terdiri atas: g_1 = sukrosa; g_2 = glukosa; g_3 = fruktosa; g_4 = maltosa. Faktor ke 2 adalah salinitas (s) yang terdiri atas: s_0 = tidak salin (tawar); s_1 = salinitas rendah (kadar garam 0,4%); s_2 = salinitas sedang (kadar garam 0,8%).

Prosedur penelitian

Satu ose koloni *P. aeruginosa* indigenus Madura dari kultur stock dikulturkan pada agar miring. Diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah masa inkubasi 1 ml suspensi dengan kerapatan sel 10^6 cfu/ml diinokulasikan pada 300 ml media *Pikovskaya* cair dengan jenis gula (sumber energi dan karbon) dan salinitas sesuai dengan perlakuan. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar dan diamati

kerapatan sel dan fosfat terlarut pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam setelah inokulasi. Pengamatan terhadap kerapian sel dilakukan dengan metode pour plate (Benson, 1990), pengamatan terhadap konsentrasi ion fosfat (fosfat terlarut) dilakukan menurut metode Olsen (Prasetyo *et al.*, 2005). Selanjutnya terhadap data hasil pengamatan dilakukan analisis secara deskriptif.

Kajian Tentang Jenis Rhizosfer

Penelitian dilakukan pada pot yang terbuat dari ember plastik dengan volume 3 liter. Setiap unit eksperimen terdiri dari 1 pot, dengan satu rumpun padi pada setiap pot. Digunakan perlakuan faktor ke 1 jenis rizosfer (r) yang terdiri atas: r_1 = rizosfer padi sawah; r_2 = rizosfer padi ladang. Faktor ke 2 adalah salinitas (s) yang terdiri atas: s_0 = tidak salin (tawar); s_1 = salinitas rendah (kadar garam 0,4%); s_2 = salinitas sedang (kadar garam 0,8%). Faktor ke 3 adalah amendasi (pemberian) *P. aeruginosa* (a) yang terdiri atas: a_0 = tanpa amendasi; a_1 = amendasi *P. aeruginosa*.

Prosedur penelitian

Persiapan media

Pada tanah yang digunakan sebagai media tanam (rhizosfer) terlebih dahulu dikering anginkan, kemudian disaring dengan saringan tanah berdiameter 0,25 cm. Sebelum digunakan sebagai media tanam terlebih dahulu dilakukan analisis fosfat, kepadatan populasi pseudomonad pendarfluor tiap gram tanah, pH dan salinitas. Selanjutnya media tanam dimasukkan ke dalam pot, pot tanpa lubang dasarnya digunakan untuk membuat rhizosfer padi sawah, sedangkan untuk rhizosfer padi ladang di dasarnya dilegkapi lubang pembuangan air. Tingkat salinitas pada rhizosfer dibuat dengan memberikan larutan garam sesuai perlakuan. Salinitas pada rhizosfer padi ladang dipertahankan dengan melakukan penyiraman dengan air tawar sebatas kapasitas lapang (tidak sampai terjadi infiltrasi ke luar pot).

Persiapan inokulan

Satu ose koloni *P. aeruginosa* indigenus Madura dari kultur stock dikulturkan pada agar miring. Diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah masa inkubasi 10 ml suspensi dengan kerapatan sel 10^6 cfu/ml digunakan sebagai inokulan pada setiap pot.

Penanaman

Benih padi langsung ditanam sebanyak 3 biji setiap pot (tanpa disemaikan). 10 hari

setelah tanam disisakan 2 tanaman setiap pot. Pada saat tersebut diberikan pupuk ZA, SP36 dan KCl masing-masing sebanyak 1,05 g, 1,4 g dan 1,4 g untuk perlakuan (a_0) dan pupuk ZA dan KCl masing-masing 1,05 g dan 1,4 g dan amendasi *Pseudomonas aeruginosa* untuk perlakuan (a_1). Selanjutnya pada perlakuan (r_1) dilakukan penggenangan dan pada (r_2) kelembaban tanah dipertahankan pada kondisi kapasitas lapang.

Pemeliharaan

Semua unit eksperimen dipelihara bebas dari gulma, pada saat memasuki stadia anakan dilakukan pemupukan ZA yang kedua 1,05 g setiap pot. Pada (r_1) sebelum pemupukan terlebih dahulu air di kurangi sampai tidak terjadi genangan.

Pengamatan variabel respon

Populasi sel pseudomonad pendarfluor tiap 10 g rhizosfer, fosfat tersedia, dan jumlah

anakan pada stadia pertumbuhan vegetatif padi. Pengamatan terhadap populasi sel dilakukan dengan metode *pour plate* (Benson, 1990) pada media King's B, fosfat tersedia dilakukan menurut metode Olsen (Prasetyo *et al.*, 2005). Selanjutnya terhadap data hasil pengamatan yang diperoleh dilakukan analisa secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi fosfat pada media kultur menurun seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Pada semua kondisi salinitas media kultur, pada 24 jam setelah inkubasi glukosa sebagai sumber energi dan atau sumber karbon memberikan konsentrasi fosfat tertinggi, namun pada 48 jam setelah inkubasi fruktosa memberikan konsentrasi fosfat tertinggi, sedangkan pada 72 jam setelah inkubasi sukrosa atau fruktosa memberikan konsentrasi fosfat tertinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Konsentrasi fosfat pada media kultur (ppm)

Perlakuan		Konsentrasi fosfat (ppm) jam setelah inkubasi		
Salinitas	Sumber karbon	24	48	72
Tidak salin	Sukrosa	24,98	23,24	20,66
	Glukosa	27,06	24,05	19,16
	Fruktosa	26,26	25,12	20,53
	Maltosa	24,21	23,94	20,62
Rendah	Sukrosa	22,34	21,36	19,28
	Glukosa	24,75	22,17	17,45
	Fruktosa	24,29	23,58	18,22
	Maltosa	22,053	22,06	18,46
Sedang	Sukrosa	21,33	19,86	18,19
	Glukosa	23,40	21,14	16,68
	Fruktosa	22,94	22,08	16,99
	Maltosa	21,01	20,83	18,03

Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas pelarutan fosfat dipengaruhi oleh energi yang terdapat pada masing-masing senyawa gula tersebut. Senyawa sumber karbon yang sederhana memberikan pertumbuhan sel akan

lebih cepat sehingga dihasilkan fosfat yang lebih banyak, namun pada akhir inkubasi pertumbuhan sel tersebut mengambil fosfat itu kembali untuk menjang pertumbuhannya, sehingga pada periode tersebut konsentrasi

fosfat yang dihasilkan menjadi lebih rendah dibandingkan dengan sumber karbon yang lebih kompleks, yaitu sukrosa dan maltosa merupakan oligosakarida (disakarida) sedangkan glukosa dan fruktosa merupakan monosakarida.

Demikian juga dengan kondisi kelimpahan sel, sumber energi dari glukosa dan fruktosa pada 24 jam setelah inokulasi memberikan kelimpahan sel yang lebih tinggi

dari pada sukrosa dan maltosa (Tabel 2), hal ini menunjukkan pertumbuhan sel pada media yang sumber energinya berasal dari disakarida lebih lambat dari pada yang berasal dari monosakarida. Kondisi ini dapat diakibatkan untuk mendapatkan pertumbuhan optimalnya terlebih dahulu mikroba tersebut harus menyediakan monosakarida yang diperoleh dari hasil pemecahan disakarida.

Tabel 2. Rata-rata kelimpahan sel (cfu/mL) pada media kultur

Salinitas	Perlakuan Sumber Karbon	Kerapatan sel (cfu/mL) jam setelah diinkubasikan		
		24	48	72
Tidak salin	Sukrosa	11,6	11,76	11,7
	Glukosa	12,2	12,26	12,2
	Fruktosa	12	12,1	12,03
	Maltosa	11,5	11,6	11,5
Rendah	Sukrosa	9,6	9,66	9,6
	Glukosa	10,1	10	10,06
	Fruktosa	10	10,06	10
	Maltosa	9,4	9,46	9,4
Sedang	Sukrosa	6,8	6,73	6,8
	Glukosa	8,6	8,66	8,6
	Fruktosa	8,5	8,56	8,5
	Maltosa	7,6	7,66	7,63

Keterangan: Data yang ditulis hasil transformasi ke bilangan logaritma

Meningkatnya salinitas media kultur mengakibatkan penurunan konsentrasi fosfat, hal ini terjadi pada semua jenis sumber karbon. Kondisi ini menunjukkan bahwa salinitas mempengaruhi aktifitas pelarutan fosfat. Hal ini sesuai yang dikemukakan oleh Reyes *et al.*, (2007) bahwa kemampuan dan pelarutan fosfat dikendalikan oleh kondisi nutrisi, fisiologi dan pertumbuhan mikroba. Terkait dengan hal tersebut Vyas dan Gulati (2009) menjelaskan bahwa jenis senyawa karbon yang digunakan sebagai sumber energi bagi pelarut fosfat akan menentukan kualitas atau jenis asam organik yang diekskresikan oleh bakteri pelarut fosfat,

dan jenis asam organik akan menentukan tingkat kelarutan fosfat.

Kelimpahan sel pada masing-masing periode inkubasi pada semua sumber karbon ternyata cenderung tetap (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa pada 24 – 72 jam setelah inkubasi pertumbuhan sel pada media kultur tersebut telah berada pada fase pertumbuhan stasioner, akan tetapi pertumbuhan sel yang menggantikan populasi sel yang mati tersebut dapat menggunakan fosfat terlarut yang pada media kultur. Sehingga pada 48 dan 72 jam setelah inkubasi konsentrasi fosfat pada media kultur lebih rendah dari pada 24 jam setelah inkubasi (Tabel 1). Dijelaskan oleh Pawana *et*

al. (2013), bahwa kondisi tersebut diduga selain melakukan pelarutan atau mobilisasi fosfat bakteri pelarut fosfat juga melakukan immobilisasi fosfat atau menggunakan fosfat terlarut untuk bioaktivitasnya memproduksi biomassa. Pernyataan ini sesuai dengan yang

sebutkan oleh Illmer dan Schinner (1995), Khan dan Bhatnagar (1997), bahwa di dalam media kultur dapat terjadi pengendapan dan pelarutan kembali terhadap fosfat organik atau anorganik yang dihasilkan, kemudian digunakan kembali sebagai sumber nutrisi.

Tabel 3. Rata-rata Populasi sel PF (cfu. 10^{-1} g rhizosfer)

Rhizosfer	Perlakuan		Tanpa Amendasi	Amendasi
	Rhizosfer	Salinitas		
Sawah		Tidak salin	$8,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^{11}$
		Rendah	$5,3 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$
		Sedang	$3,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
Ladang		Tidak salin	$8,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^{12}$
		Rendah	$5,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
		Sedang	$4,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$

Tabel 4. Fosfat tersedia (mg/kg rhizosfer)

Rhizosfer	Perlakuan		Tanpa Amendasi	Amendasi
	Rhizosfer	Salinitas		
Sawah		Tidak salin	1,87	3,2
		Rendah	1,22	1,54
		Sedang	1,06	1,22
Ladang		Tidak salin	1,97	3,3
		Rendah	1,42	1,87
		Sedang	1,35	1,56

Populasi bakteri pseudomonad pendarfluor (PF) dipengaruhi oleh jenis rhizosfer dan tingkat salinitas (Tabel 3). Pada rhizosfer padi ladang diperoleh kelimpahan PF yang lebih tinggi dari pada padi sawah, hal ini akibat kondisi oksigen pada rhizosfer padi sawah yang lebih terbatas dari pada rhizosfer padi ladang, yang mengakibatkan pertumbuhan populasi PF pada rhizosfer padi sawah lebih rendah. Demikian juga dengan kondisi salinitas, bahwa meningkatnya salinitas mengakibatkan penurunan kelimpahan populasi

PF. Kondisi kelimpahan populasi PF ini berdampak pada ketersediaan fosfat pada rhizosfer (Tabel 4), bahwa pada rhizosfer dengan tingkat kelimpahan PF yang tinggi (rhizosfer padi ladang) telah memberikan fosfat tersedia yang lebih tinggi, sehingga ketersediaan fosfat yang lebih tinggi ini memberikan jumlah anakan (pertumbuhan vegetatif) padi yang lebih baik (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa ketersediaan fosfat tersebut telah memberikan kontribusi yang berarti bagi pertumbuhan vegetatif padi.

Tabel 5 Rata-rata Jumlah anakan

Rhizosfer	Perlakuan		Tanpa Amendasi	Amendasi
	Rhizosfer	Salinitas		
Sawah		Tidak salin	8,7	10,3
		Rendah	5,9	6,8
		Sedang	5,3	5,5
Ladang		Tidak salin	9,1	12,4
		Rendah	6,2	7,2
		Sedang	5,6	6,4

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

Jenis senyawa sumber karbon dan tingkat salinitas mempengaruhi konsentrasi fosfat pada media kultur dan kelimpahan sel bakteri pelarut fosfat. Meningkatnya tingkat salinitas

menurunkan kelimpahan sel. Populasi sel bakteri pseudomonad pendarfluor pelarut fosfat pada rhizosfer padi ladang lebih tinggi dari pada rhizosfer padi sawah, tingkat populasi sel PF yang lebih tinggi memberikan fosfat tersedia lebih tinggi dan pertumbuhan vegetatif yang lebih baik.

Saran

Perlu dilakukan kajian terhadap senyawa-senyawa sumber karbon lain, mengingat akar tanaman mengekskresikan berbagai senyawa sumber karbon pada jenis gula yang beragam.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DP2M Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Penelitian Fundamental tahun 2013

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M. 2004. Handbook of Microbiological Media Third Edition. Ann Arbor. MI: CRC Press.
- Bagyaraj, D. J, P. U. Krishnaraj, S. P. S. Khanuja. 2000. Mineral phosphate solubilization: Agronomic implications, mechanism and molekular genetics. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* (PINSAs) B66 Nos 2 & 3. 69-82
- Benson, H. J. 1990. *Microbiological Applications A Laboratory Manual in General Microbiology Fifth Edition*. Dubuque. Wm.C.Brown Publishers, hlm. 52-54.
- Brimecombe, M. J. , F. A. De Leij, J. M. Lynch. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial population di dalam The Rhizosphere Biochemistry and Organik substances at the Soil-Plant Interface. (ed. Pinton, R., Z. Varanini, P. Nannipieri). New York. Marcel Dekker. 95-140.
- Fankem, H., L. Ngo Nkot, A. Deubel, J. Quinn, W. Merbach, F. X. Etoa, D. Nwaga. 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soil of Cameroon. *Afric. J. Microbiol. Research* 2: 171-178.
- Illmer, P., F. Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate-Solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 7: 257-263.
- Khan, A. A., G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. S. Naqvi, M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1: 48-58.
- Khan, J. A. , R. M. Bhatnagar. 1997. Studies on solubilization of insoluble phosphate rocks by *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* *Fertil Technol.* 14:329-333.
- Pawana, G., M. Tripatmasari, A. Supriyanto. 2010. Pengembangan Teknologi Sarana Produksi Pengganti Untuk Budidaya Tembakau Madura. Riset Unggulan 2009 Universitas Trunojoyo. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Trunojoyo, hlm. 19-31.
- Pawana, G., Syekhfani, T. Surtiningsih, W. S. Wahyuni. 2013. Fluorescent pseudomonad Madura indigenous phosphate solubilizing and their behavior of phosphate solubilization. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4: 524-531.
- Prasetyo, B. H., D. Santoso, L. R. Widowati. 2005. *Petunjuk Teknis Analisa Kimia Tanah, Tanaman, Air dan Pupuk*. Balai Penelitian Tanah. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta. Departemen Pertanian.
- Reyes, I, A. Valery, Z. Valduz. 2007. Phosphate solubilizing microorganism isolate from rhizospheric and bulk soil of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. Di dalam E. Velazquez dan C. Rodriguez-Barrueco (edt). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. 69-75.
- Rodriguez, H., R. Fraga. 1999. Phosphate Solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17 (1999): 319-339.
- Vega, N. W. O. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin* 60: 3621-3643.
- Vyas, P., A. Gulati. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promoting in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonad. *BCM Microbiology* 9: 174.