

Isolat *Bacillus* Pelarut Fosfat dari Kalimas Surabaya

Nadia Ulfiyati dan Enny Zulaika

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: ennyzulaika@bio.its.ac.id

Abstrak—Ketersediaan fosfat terlarut di dalam tanah sangat terbatas karena kecenderungannya terikat dengan mineral tanah membentuk fosfat kompleks. Bakteri pelarut fosfat, salah satunya adalah *Bacillus*, dapat digunakan untuk membantu ketersediaan fosfat terlarut di dalam tanah sehingga dapat menggantikan pupuk fosfat. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui potensi isolat *Bacillus* spp. koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS Surabaya dalam melarutkan fosfat. Potensi pelarutan fosfat dilihat dari kemampuannya membentuk zona bening pada medium Pikovskaya. Hasil penelitian menunjukkan *Bacillus* S1, *Bacillus* SS19, dan *Bacillus* DA11 mampu melarutkan fosfat secara kualitatif dengan nilai IPF secara berurutan 2,44; 2,34; dan 2,42. Berdasarkan nilai IPFnya, *Bacillus* S1 memiliki kemampuan melarutkan fosfat tertinggi dibanding isolat *Bacillus* SS19 dan *Bacillus* DA11.

Kata Kunci—*Bacillus*, fosfat terlarut, indeks pelarutan fosfat, Pikovskaya.

I. PENDAHULUAN

FOSFOR merupakan nutrisi kedua yang sangat dibutuhkan oleh tanaman setelah nitrogen [1]. Sebagian besar fosfor terdapat di alam dalam bentuk fosfat [2]. Fosfat dapat berbentuk senyawa organik maupun anorganik. Di alam, fosfat tersedia dalam konsentrasi rendah karena fosfat difiksasi membentuk kompleks fosfat besi, aluminium, dan kalsium yang tidak larut. Kekurangan fosfat merupakan faktor pembatas pertumbuhan yang utama untuk tanaman, sehingga penambahan pupuk kimia berfosfat dilakukan untuk mengoptimalkan hasil tanaman tersebut [1].

Ketersediaan fosfat bagi tanaman dapat ditanggulangi dengan agen hayati berupa mikroorganisme yang mampu melarutkan fosfat di tanah secara alami [3]. Bakteri yang mampu melarutkan fosfat antara lain *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* [4], *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia*, dan *Rhizobium* [5]. Kelompok bakteri pelarut fosfat di lahan Indonesia yang melimpah adalah dari genus *Enterobacter* dan *Mycobacterium* [6]. Beberapa jenis *Bacillus* yang mampu melarutkan fosfat yaitu *B. megatherium* dan *B. circulans* [7].

Bacillus spp. yang disolasi dari Kalimas Surabaya telah diketahui mampu menghasilkan asam organik dari metabolisme karbohidrat [8], dimana sekresi asam organik merupakan salah satu mekanisme untuk pelarutan fosfat oleh

bakteri. Sedangkan untuk potensi pelarutan fosfat sendiri, isolat *Bacillus* dari Kalimas Surabaya belum pernah diteliti.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Bacillus* endogenik Kalimas yang berpotensi melarutkan fosfat secara kualitatif.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan sejak bulan Desember 2014 sampai dengan April 2015. Tempat penelitian di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

B. Subkultur Isolat Uji

Isolat yang digunakan adalah *Bacillus* koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, dengan kode isolat S1, SS19, DA11, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178. Serta *Azotobacter chroococcum* sebagai isolat pembanding. Isolat diinokulasikan pada medium *Nutrient Agar* miring secara aseptik dengan metode *streak continue*. Subkultur diinkubasi 24 jam atau lebih pada suhu ruangan [9].

C. Medium Pikovskaya

Kemampuan bakteri pelarut fosfat diseleksi menggunakan medium Pikovskaya [10]. Bahan untuk membuat medium Pikovskaya per liter nya adalah glukosa 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g; NaCl 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; KCl 0,2 g; yeast ekstrak 0,5 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g [11]. Semua bahan dilarutkan dengan akuades hingga volume 1 L dan dihomogenkan. Pembuatan medium Pikovskaya padat dilakukan dengan penambahan agar sebanyak 15 g. Medium tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 20 menit.

D. Uji Pelarutan Fosfat oleh *Bacillus* secara Kualitatif

Isolat diinokulasikan pada medium Pikovskaya agar menggunakan metode *spot inoculation*. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu ruang [1] dan diamati setiap 24 jam selama 7 hari. Koloni yang membentuk zona bening pada medium Pikovskaya diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [12]. Diameter zona bening dan diameter koloni dihitung setiap 24 jam selama 7 hari untuk

mendapatkan lebar zona bening (LZB) dan indeks pelarutan fosfat (IPF) menggunakan formula (1) dan (2) [1].

$$LZB = DZB - DK \tag{1}$$

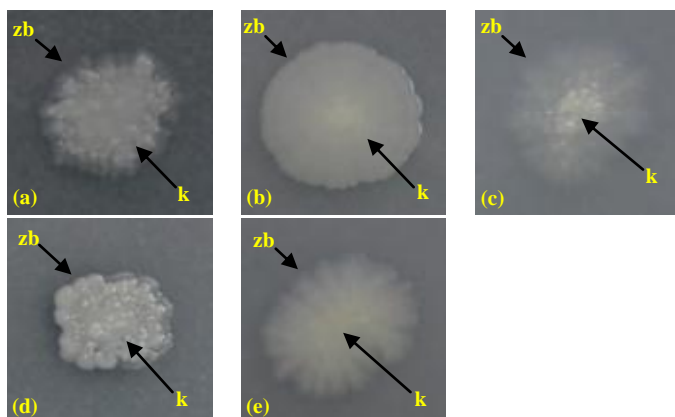
$$IPF = \frac{DK+DZB}{DK} \tag{2}$$

III. HASIL DAN DISKUSI

Semua isolat *Bacillus* dan *Azotobacter chroococcum* berpotensi melarutkan fosfat yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Gambar 1). Berdasarkan kecepatan terbentuknya zona bening, kemampuan masing-masing isolat dalam melarutkan fosfat bervariasi. *Bacillus* S1 dan *Bacillus* SS19 membentuk zona bening setelah 24 jam inkubasi, *Bacillus cereus* ATCC 1178 pada jam 48, *Azotobacter chroococcum* pada jam 72, dan *Bacillus* DA11 pada jam ke 96. Medium Pikovskaya memiliki warna putih keruh disebabkan kandungan trikalsium fosfat ($Ca_3[PO_4]_2$) sebagai fosfat tidak larut dalam medium [Raharjo *et al.*, 2007].

Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni merupakan indikasi bahwa isolat mampu melarutkan fosfat kompleks. Zona bening pada agar dapat terbentuk akibat pelarutan suspensi trikalsium fosfat ($Ca_3[PO_4]_2$) [1]. Pembentukan zona bening pada medium Pikovskaya mengindikasikan bahwa mikroorganisme tersebut dapat melarutkan fosfat [13].

Empat isolat *Bacillus* uji serta *Azotobacter chroococcum* mampu melakukan mekanisme pelarutan fosfat, diduga karena kemampuannya dalam menghasilkan asam organik. *Bacillus* S1, *Bacillus* SS19, *Bacillus* DA11, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 diketahui membentuk asam melalui katabolisme dari beberapa sumber gula [8]. *Azotobacter chroococcum* mampu menghasilkan asam organik, seperti asam indol asetat [14]. Mikroorganisme mampu menurunkan pH di dalam medium tumbuhnya melalui produksi asam organik atau proton-proton yang menyebabkan pelarutan kompleks mineral-fosfat melalui pertukaran anion PO_4^{2-} dengan anion asam atau pengkhelatan ion mineral yang mengikat fosfat [15]. Jika pH medium dinaikkan, maka fosfat terlarut dapat bereaksi kembali (refiksasi) dengan ion pengikat [14].



Gambar 1. Koloni Isolat dan Zona Bening yang Terbentuk selama 7 Hari (Keterangan: zb = zona bening; k = koloni Isolat; a = *Bacillus* S1; b = *Bacillus* SS19; c = *Bacillus* DA11; d = *Bacillus cereus* ATCC 1178; e = *Azotobacter chroococcum*).

Semua isolat uji mengalami pertambahan diameter koloni seiring dengan waktu inkubasi (Tabel 1). Hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan isolat pada medium Pikovskaya. Pada hari terakhir pengamatan (7 x 24 jam), *Bacillus cereus* ATCC 1178 memiliki diameter koloni serta diameter zona bening terkecil, sedangkan *Bacillus* SS19 berdiameter koloni dan berdiameter zona bening terbesar. Begitu pula lebar zona bening *Bacillus cereus* ATCC 1178 merupakan nilai terendah dan *Bacillus* SS19 memiliki lebar zona bening tertinggi diantara isolat lainnya. Lebar zona bening merupakan hasil selisih antara diameter koloni dengan diameter zona bening. Pada umumnya, diameter zona bening akan mengalami pertambahan seiring dengan bertambahnya diameter koloni [1].

Bacillus cereus ATCC 1178 mempunyai nilai IPF tertinggi dibanding isolat lainnya, diikuti dengan *Bacillus* S1. Sedangkan *Bacillus* SS19 memiliki nilai IPF terendah. Indeks pelarutan fosfat diperoleh dari rasio diameter total (DK + DZB) dengan diameter koloni. Besarnya lebar zona bening tidak selalu mengindikasikan banyaknya jumlah konsentrasi fosfat yang terlarut [1]. Kemampuan pelarutan fosfat bakteri dapat dilihat dari nilai indeks pelarutan fosfatnya [16]. Sehingga berdasarkan nilai IPF, *Bacillus cereus* ATCC 1178 dan *Bacillus* S1 memiliki potensi pelarutan fosfat lebih tinggi dibanding isolat uji lainnya.

Mekanisme pelarutan fosfat oleh isolat uji dikaitkan dengan kemampuannya dalam menghasilkan asam organik. Semua genus *Bacillus* di atas telah diuji menghasilkan asam dari metabolisme glukosa [8], dimana sumber karbon pada medium Pikovskaya adalah glukosa. Asam organik diketahui mampu menurunkan pH dan menyebabkan pelarutan fosfat [17]. Meskipun demikian, belum diketahui jenis dan jumlah asam organik yang dihasilkan masing-masing isolat *Bacillus*. Diperkirakan, jenis asam organik yang diproduksi tiap isolat berbeda, sehingga mempengaruhi kemampuan pelarutan fosfat kompleks pada medium. Aktivitas pelarutan fosfat dapat diketahui dari kemampuan biokimia bakteri dalam menghasilkan asam organik, yang mampu mengkhelat kation (terutama Ca) yang berikatan dengan fosfat melalui gugus karboksilnya sehingga fosfat lepas dan menjadi terlarut [5]. Jenis dan jumlah asam organik yang dihasilkan mikroorganisme pelarut fosfat tergantung dari strain, komposisi media, kondisi pertumbuhan, dan lainnya [18].

Tabel 1 Lebar Zona Bening dan Indeks Pelarutan Fosfat setelah 7 Hari Inkubasi

No	Isolat	DK (cm)	DZB (cm)	LZB (cm)	IPF
1	<i>Bacillus</i> S1	0,58	0,82	0,24	2,44
2	<i>Bacillus</i> SS19	0,8	1,05	0,25	2,34
3	<i>Bacillus</i> DA11	0,6	0,84	0,24	2,42
4	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 1178	0,43	0,63	0,2	2,52
5	<i>Azotobacter chroococcum</i>	0,52	0,73	0,21	2,40

Keterangan: DK = diameter koloni; DZB = diameter zona bening; LZB = lebar zona bening; IPF = indeks pelarutan fosfat

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah dilakukan, maka kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. *Bacillus* S1, *Bacillus* SS19, dan *Bacillus* DA11 endogenik Kalimas mampu melarutkan fosfat secara kualitatif yang ditunjukkan dengan pembentukan zona bening pada medium Pikovskaya. Nilai IPF *Bacillus* S1 = 2,44; *Bacillus* SS19 = 2,34; dan *Bacillus* DA11 = 2,42. Demikian pula *Bacillus cereus* ATCC 1178 memiliki nilai IPF 2,52.
2. *Bacillus* S1 memiliki kemampuan melarutkan fosfat tertinggi dibanding isolat *Bacillus* SS19 dan *Bacillus* DA11.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Enny Zulaika, M.P. yang telah memberikan dukungan melalui pendanaan PNBP ITS sesuai nomor kontrak: 003246.256/IT2.11/PN.08/2015.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. Alam, S. Khalil, N. Ayub, dan M. Rashid, "In vitro Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere," *International Journal of Agriculture & Biology*, Vol. 4, No. 4 (2002) 454-458.
- [2] L. S. Clescerl, A. E. Greenberg, dan A. D. Eaton, "Standard Methods for Examination of Water & Wastewater 20th Edition," Washington, D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (1999).
- [3] A. A. Khan, G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. S. Naqvi, dan M. Rasheed, "Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production," *Journal Agriculture Biol. Sci.*, Vol. 1, No. 1 (2009) 48-58.
- [4] H. Rodríguez dan R. Fraga, "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion," *Biotechnology Advances*, Vol. 17 (1999) 319-339.
- [5] Y. P. Chen, P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. A. Lai, dan C. C. Young, "Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities," *Applied Soil Ecology*, Vol. 34, No. 1 (2006) 33-41.
- [6] R. C. B. Ginting, R. Saraswati, dan E. Husen, "Pupuk Organik dan Pupuk Hayati," Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian (2006).
- [7] P. D. Bajpai dan W. V. B. S. Rao, "Extracellular Production of Organic Acids by Selected Bacteria Solubilising Insoluble Phosphate," *Phosphate solubilising bacteria, Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 17, No. 2 (2012) 44-45.
- [8] E. Zulaika, L. Sembiring, dan A. Soegianto, "Characterization and Identification Of Mercury-resistant Bacteria From Kalimas River Surabaya-Indonesia By Numerical Phenetic Taxonomy," *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, Vol. 2, No. 7 (2012) 7263-7269.
- [9] J. P. Harley dan L. M. Prescott, "Laboratory Exercises in Microbiology 5th Edition," U.S.A: McGraw-Hill Publishers (2002).
- [10] M. G. Z. Girgis, H. M. A. Khalil, dan M. S. Sharaf, "In Vitro Evaluation of Rock Phosphate and Potassium Solubilizing Potential of Some *Bacillus* Strains," *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 2, No.1 (2008) 68-81.
- [11] A. B. Saragih, "Skrling Bakteri Pelarut Fosfat Adaptif Vinasse dari Lahan Tebu Pabrik Gula Jatiroto Kabupaten Lumajang Jawa Timur," Skripsi, Jurusan Biologi, Universitas Jember, Jember, Indonesia (2013).
- [12] A. Prasanna, V. Deepa, P. B. Murthy, M. Deecaraman, R. Sridhar, dan P. Dhandapani, "Insoluble Phosphate Solubilization by Bacterial Strains Isolated from Rice Rhizosphere Soils from Southern India," *International Journal of Soil Science*, Vol. 6, No. 2 (2011) 134-141.
- [13] S. Mehta dan C. S. Nautiyal, "An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria," *Current Microbiology*, Vol. 43 (2001) 51-56.
- [14] V. Kumar dan N. Narula, "Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Emergence of Wheat as Affected by *Azotobacter chroococcum* Mutans," *Biology Fertile Soils*, Vol. 28 (1999) 301-305.
- [15] P. Gyaneshwar, G. N. Kumar, L. J. Parekh, dan P. S. Poole, "Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants," *Plant and Soil*, Vol. 245 (2002) 83-93.
- [16] A. E. Hesham dan H. M. Mohamed, "Molecular Genetic Identification of Yeast Strains Isolated from Egyptian Soils for Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Promotion of Corn Plants," *Journal Microbiology Biotechnology*, Vol. 21, No. 1 (2011) 55-61.
- [17] M. T. Islam, A. Deoraa, Y. Hashidokoa, A. Rahmana, T. Itoa, dan S. Tahara, "Isolation and Identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh," *Phosphate Solubilizing Soil Bacteria*, Vol. 62 (2007) 103-110.
- [18] M. Jayadi, Baharuddin, dan B. Ibrahim, "In Vitro Selection of Rock Phosphate Solubility by Microorganism from Ultisols in South Sulawesi, Indonesia," *American Journal of Agriculture and Forestry*, Vol. 1, No. 4 (2013) 68-73.