

## Seleksi Mikroba Rizosfer Lokal Untuk Bahan Bioaktif pada Inokulan Berbasis Kompos Iradiasi

### *Selection of Rhizosphere Local Microbial as Bioactive Inoculant Based on Irradiated Compost*

Dadang Sudrajat, Nana Mulyana dan Arief Adhari

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN  
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta Selatan 12440  
Email : dadangs61@batan.go.id

Diterima 19-2-2014; Diterima dengan revisi 7-3-2014; Disetujui 21-4-2014

#### ABSTRAK

**Seleksi Mikroba Rizosfer Lokal Untuk Bahan Bioaktif pada Inokulan Berbasis Kompos Iradiasi.** Salah satu komponen utama sebagai bahan aktif dalam bahan pembawa (*carrier*) kompos iradiasi untuk pembuatan pupuk organik hayati (POH) adalah isolat mikroba potensial yang berperan dalam penyedia hara serta hormon pemacu pertumbuhan. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat-isolat mikroba pada daerah perakaran tanaman (rizosfer), selanjutnya dilakukan isolasi dan seleksi sehingga diperoleh isolat potensial yang berkemampuan fiksasi nitrogen ( $N_2$ ), menghasilkan hormon pertumbuhan (Asam Indol Asetat), dan melarutkan fosfat. Isolat potensial tersebut kemudian digunakan sebagai bahan bioaktif pada pembuatan formulasi inokulan konsorsium mikroba rizosfer berbasis kompos radiasi. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah isolasi mikroba dari beberapa lokasi di wilayah Jawa Barat, Yogyakarta dan Jawa Tengah. Hasil isolasi mikroba dari 48 contoh tanah rizosfer, diperoleh 116 isolat. Selanjutnya dilakukan seleksi, dan identifikasi mikroba, untuk memperoleh isolat yang unggul. Parameter yang diukur adalah analisis kandungan Asam Indoksil Asetat (AIA) dengan metode kolorimetri, uji penambat  $N_2$  dengan metode *Acetylene Reduction Assay (ARA)* menggunakan Gas Kromatografi, uji kelarutan fosfat secara kualitatif dalam media *Pikovskaya* dan uji kuantitatif fosfat terlarut (spektrofotometri). Evaluasi kemampuan isolat terpilih terhadap pertumbuhan tanaman jagung dilakukan di dalam pot. Isolat hasil evaluasi akan digunakan sebagai inokulan konsorsium mikroba rizosfer berbasis kompos iradiasi. Berdasarkan hasil seleksi terhadap isolat bakteri diperoleh 8 isolat unggul bakteri yang sudah diidentifikasi sebagai *Bacillus circulans* (3 isolat), *Bacillus stearothermophilus* (1 isolat), *Azotobacter* sp (3 isolat) *Pseudomonas diminuta* (1 isolat). Kemampuan pelarutan fosfat yang tertinggi diperoleh isolat BD2 (*Bacillus circulans*) yaitu sebesar 91,21 mg/l dengan ukuran zona bening dalam medium pikovskaya 1,32 cm. Kemampuan produksi hormon AIA yang paling tinggi dicapai isolat *Pseudomonas diminuta* (kode KACI) yaitu sebesar 74,34  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan Kemampuan fiksasi  $N_2$  tertinggi dicapai isolat *Azotobacter* sp (kode KDB2) yaitu sebesar 235,05 nmol/jam. Hasil uji viabilitas sel delapan (8) isolat terpilih dalam bahan pembawa kompos iradiasi sedikit mengalami penurunan selama 3 bulan penyimpanan. Inokulan dalam bahan pembawa kompos iradiasi mampu memacu pertumbuhan tanaman jagung. Inokulan yang berisi isolat *Azotobacter* sp (KDB2) merupakan inokulan paling potensial.

**Kata kunci :** Mikroba rizosfer, isolasi, seleksi, kompos iradiasi, inokulan

#### ABSTRACT

**Selection of Rhizosphere Local Microbial as Bioactive Inoculant Based on Irradiated Compost.** One of the main components of carrier based on irradiation compost for bio organic fertilizer is a potential microbial isolates role in nutrient supply and growth hormone. This research was conducted to obtain microbial isolates from plant root zone (rhizosphere), further isolation and selection in order to obtain potential isolates capable of

nitrogen fixation ( $N_2$ ), resulting in growth hormone (Indole Acetic Acid), and phosphate solubilizing. Selected potential isolates used as bioactive microbial inoculants formulation in irradiation compost based. Forty eight (48) rhizosphere samples were collected from different areas of West and Central Java. One hundred sixteen (116) isolates have been characterized for their morphological, cultural, staining and biochemical characteristics. Isolates have been selected for further screening of PGPR traits. Parameters assessed were Indole Acetic Acid (IAA) content analysis with colorimetric methods, dinitrogen fixation using gas chromatography, phosphate solubility test qualitatively (in the media pikovskaya) and quantitative assay of dissolved phosphate (spectrophotometry). Evaluation of the ability of selected isolates on the growth of corn plants were done in pots. The isolates will be used as inoculant consortium base on compost irradiation. The selection obtained eight (8) bacterial isolates identified as *Bacillus circulans* (3 isolates), *Bacillus stearothermophilus* (1 isolate), *Azotobacter* sp (3 isolates), *Pseudomonas diminuta* (1 isolate). The highest phosphate released (91,21 mg/l) was by BD2 isolate (*Bacillus circulans*) with a halo zone size (1.32 cm) on Pikovskaya agar medium. Isolate of *Pseudomonas diminuta* (KACI) was capable to produce the highest IAA hormone (74.34  $\mu$ g/ml). The highest nitrogen ( $N_2$ ) fixation activity was shown by *Azotobacter* sp isolates (KDB2) at a rate of 235.05 nmol/hour. The viability test showed that all selected isolates in compost irradiation carrier slightly decreased after 3 months of storage. Irradiated compost carrier contained *Azotobacter* sp isolates (KDB2) was the most potential inoculant to induced corn plant growth.

**Keywords :** Rhizosphere microorganisms, isolation, selection, irradiation compost, inoculant

## PENDAHULUAN

Dalam upaya mengurangi pencemaran lingkungan dan pemanasan global di lahan pertanian yang disebabkan oleh penggunaan pupuk kimia yang berlebihan, maka perlu dicari alternatif penggunaan pupuk yang ramah lingkungan. Pupuk berbasis mikroba dalam hal ini pupuk organik hayati (POH) merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah untuk mengurangi ketergantungan akan pemakaian pupuk kimia.

Sebagian besar mikroba tanah berpotensi sebagai bahan aktif POH, terutama kelompok mikroba yang hidup pada daerah perakaran (*rhizosphere*). Kelompok mikroba tersebut telah diketahui mempunyai kemampuan untuk memfiksasi  $N_2$ . Disamping itu juga penghasil hormon pemacu pertumbuhan, melarutkan fosfat, dan hara lainnya [1]. Mikroba tersebut juga telah terbukti dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman [2]. Mekanisme peningkatan ini tidak diketahui secara pasti, tetapi diduga melibatkan proses yang kompleks termasuk disolusi senyawa polipeptida, oksidasi, dan reduksi. Proses solubilisasi dan insolubilisasi unsur hara makro dan mikro di dalam tanah banyak

dipengaruhi oleh pH dan status mikroba tanah yang pada akhirnya berpengaruh terhadap ketersediaan unsur hara tersebut bagi tanaman. Ketersediaan fosfat di dalam tanah pada umumnya terbatas, karena sebagian besar fosfat difiksasi oleh Fe dan Al menjadi Fe-fosfat dan Al-fosfat terutama pada tanah mineral masam (pH < 5). Pada pH yang tinggi (pH > 7) fosfat akan terikat menjadi Ca-fosfat. Ca-fosfat yang sulit larut dapat tersedia bagi tanaman melalui proses pelarutan dan pembentukan senyawa organik oleh mikroba tanah [3].

Secara umum, fungsi *Plant Growth Promotor Rhizobacteria* (PGPR) dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman dibagi dalam tiga kategori, yaitu : (1) Sebagai perangsang/pemacu pertumbuhan (biostimulan) dengan mensintesis dan mengatur berbagai zat mengatur tumbuh (fitohormon) seperti asam indol asetat (AIA), giberellin, dan sitokinin dalam lingkungan akar; (2) sebagai penyedia hara dengan menambat  $N_2$  dari udara secara asimbiosis dan melarutkan hara P yang terikat dalam tanah [3]. Dalam beberapa kasus satu strain PGPR memiliki kemampuan lebih dari satu kategori fungsi sebagai penyedia hara, penambat  $N_2$ , dan perangsang pertumbuhan

yang menjadi satu kesatuan yang tidak bisa dipisahkan.

*Azotobacter* sp yang diisolasi dari tanah masam Jawa Barat mempunyai kemampuan dalam penambatan nitrogen yang unggul (>400 mg/g b.k sel). Selain itu isolat *Azotobacter* juga mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh, seperti Indol Asam Asetat (AIA) [4]. Sifat inilah yang menjelaskan pengaruh menguntungkan *Azotobacter* sehubungan dengan peran AIA dalam meningkatkan perkembangan dan pembelahan sel tanaman. AIA merangsang perkembangan akar dan memperbanyak bulu-bulu akar tanaman padi [5], dengan demikian pengambilan unsur hara melalui akar meningkat dan efektifitas pemupukan dapat dilakukan.

Berdasarkan hal-hal tersebut diatas, penelitian ini bertujuan melakukan seleksi mikroba rizosfer dari tanah disekitar Jawa Barat dan Jawa Tengah. Dari hasil seleksi ini diharapkan akan mendapatkan isolat mikroba potensial yang dapat dikembangkan sebagai bahan aktif pupuk organik hayati.

Untuk menginokulasikan mikroba unggul ke dalam tanah atau akar tanaman diperlukan medium bahan pembawa (*carrier*). Tetapi jenis bahan pembawa yang tepat bagi mikroba ini belum banyak diteliti. Bahan pembawa merupakan faktor terpenting pada pembuatan POH, karena berfungsi sebagai media pertumbuhan mikroba target yang digunakan dari proses inokulasi, penyimpanan hingga penebaran pupuk. Menurut SOMASEGARAN dan HOBEN [6], bahan pembawa yang baik untuk POH harus memenuhi pesyaratan antara lain, (1) tidak mengandung toksin bagi strain mikroba inokulan, (2) memiliki kapasitas penyerapan air yang tinggi, (3) mudah diproses, (4) mudah disterilkan dengan *autoclave* maupun iradiasi sinar gamma, (5) memiliki jumlah yang cukup, (6) murah, dan (7) memiliki kapasitas pH buffer yang baik dengan kisaran 6,5-7,0. Pada umumnya bahan pembawa yang sering digunakan adalah gambut. Pemanfaatan tanah gambut sebagai medium pembawa memiliki beberapa kelebihan. Selain

memiliki kapasitas kelembaban dan kandungan materi organik yang tinggi yang sangat penting untuk kehidupan kultur bakteri yang baik, tanah gambut juga meningkatkan kelestarian sel, terutama di dalam kondisi tanah yang kering [7]. Penggunaan gambut sebagai bahan pembawa tidak direkomendasikan di beberapa negara, karena tidak selalu tersedia di setiap tempat dan dapat mengganggu kelestarian ekosistem didaerah penambangan gambut tersebut. Bahan lain yang dapat dimanfaatkan sebagai medium pembawa adalah kompos dan vermikompos. Kompos yang dimaksud adalah kompos yang diolah dari limbah pertanian secara aerobik. Kompos yang telah masak mengandung berbagai nutrisi penting yang dibutuhkan tanaman. Pemanfaatan vermikompos tersebut sebagai bahan pembawa potensial pengganti gambut telah berhasil dikembangkan PAIR-BATAN [8]. Pada penelitian tersebut digunakan bahan pembawa berbasis kompos yang disterilkan menggunakan iradiasi sinar gamma pada dosis 25 kGy, terbukti dapat meningkatkan viabilitas mikroba target sekaligus dapat meningkatkan fungsi kompos itu sendiri sebagai pupuk organik hayati.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan peralatan

Bahan-bahan yang digunakan adalah media *Nutrient Agar* (Oxoid), *Tryptic Soy Broth* (Difco), *Tryptic Soy Agar* (oxoid), *Kings Agar* (Pronadisa), *Pikovskaya, NFB* (*Nitrogen Free Broth*), *Luria-Bertani (LB)*, larutan Pewarna *Gram*, larutan *Salkowsky*, larutan steril NaCl 0,85% dan plastik tahan panas. Peralatan yang digunakan antara lain, peralatan mikrobiologi, autoklaf (DAIHAN Scientific, Korea), pengocok, pH meter (Eutech Instrument, Singapura), neraca analitik (Acculab BL 210), spektrofotometer UV-VIS (Hitachi, Japan), *Microcentrifuge* (Sorvall), *Khromatografi Gas* (Shimadzu, Japan) dan peralatan gelas.

## Pengambilan contoh

Contoh tanah diambil dari daerah rizosfer beserta akar tanamannya. Contoh tanah tersebut diambil pada tanah masam disekitar Bogor Jawa Barat, Wonosobo dan Bantul Jawa Tengah. Contoh tanah tersebut dimasukkan kedalam kantung plastik dan diberi label yang memberikan keterangan mengenai lokasi dan waktu pengambilannya.

## Isolasi dan seleksi mikroba potensial

Isolasi bakteri dari rizosfer dilakukan dengan metode pengenceran berseri. Tanah disekitar perakaran (rizosfer) tanaman jagung (*Zea mays*), tebu (*Saccharum officinarum*), dan rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 250 ml, 90 ml larutan garam fisiologis steril (0,85% NaCl) ditambahkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil. Suspensi tanah yang telah dikocok diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah mengandung 9 ml NaCl 0,85% steril, sehingga didapatkan suspensi dengan tingkat pengenceran  $10^{-2}$ . Seterusnya dilakukan pengenceran dengan cara yang sama sehingga diperoleh suspensi  $10^{-6}$ . Selanjutnya ditanam dengan cara disebar menggunakan gelas *spreader* dalam medium agar selektif *Ashby* untuk kelompok *Azotobacter*, medium *Tryptic Soy Agar (TSA)* untuk kelompok *Bacillus sp*, dan medium *Kings Agar* untuk kelompok *Pseudomonas*. Koloni yang tumbuh kemudian diseleksi sehingga diperoleh isolat. Untuk memastikan bahwa genus mikroba tersebut, maka dilakukan serangkaian pengujian yang bersifat spesifik meliputi pengamatan mikroskopis dan uji biokimia yang mengacu pada pedoman identifikasi bakteri [9]. Pada pengamatan mikroskopis didahului dengan melakukan pewarnaan gram, sehingga dapat dilihat bentuk-bentuk bakteri dan kelompok bakteri gram positif atau negatif. Sedangkan uji biokimia dan identifikasi sampai tingkat

spesies dilakukan di Laboratorium Uji IPB Bogor.

## Uji kemampuan melarutkan Fosfat (P)

Kemampuan melarutkan fosfat dari isolat dilakukan secara kualitatif pada cawan petri yang berisi media agar *Pikovskaya* dengan komposisi per liter sebagai berikut: Glukosa; 10 g, Trikalsium fosfat ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ); 5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5 g, KCl; 0,2 g,  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g,  $\text{Mn SO}_4$  (*trace*),  $\text{FeSO}_4$  (*trace*), ekstrak ragi (*yeast extract*); 0,5 g dan agar bacto; 20 g. Isolat yang membentuk zona bening (*holozone*) paling cepat dengan diameter *holozone* paling besar dipilih. Selanjutnya dilakukan uji kemampuan melarutkan fosfat secara kuantitatif dalam media *Pikovskaya* cair menurut metode *Gaur* [10]. Pada erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml media *Pikovskaya* cair masing-masing erlenmeyer diberi isolat mikroba yang berbeda. Erlenmeyer yang berisi biakan tersebut dikocok dalam *shaker* dengan kecepatan putar 120 rpm selama 8 hari. Setiap dua hari diamati P yang dapat larut diukur dengan spektrofotometri menggunakan metode *Vanadat*.

## Pengujian kemampuan fiksasi $\text{N}_2$

Kemampuan isolat dalam memfiksasi  $\text{N}_2$  diukur dengan metode *Acetylene Reduction Assays (ARA)* [11] atau kemampuan enzim nitrogenase yang dihasilkan isolat untuk mereduksi asetilen ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ). Pengukuran ARA dilakukan pada isolat berumur empat hari yang dibiakkan dalam medium semi padat *NFB (Nitrogen Free Broth)*. Udara yang ada didalam kultur dibuang, kemudian gas asetilen dengan volume sama dengan volume udara yang dibuang diinjeksikan ke dalamnya. Setelah inkubasi selama satu jam, gas asetilen yang terbentuk diukur dengan alat Kromatografi Gas.

## Analisis kandungan Asam Indol Asetat (AIA)

Untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan hormon pertumbuhan

Asam Indol Asetat (AIA) secara *in vitro*, isolat ditumbuhkan dalam 20 ml medium *Luria Bertani (LB)* cair yang mengandung triptofan [12], masing-masing dilakukan tiga kali ulangan dan diinkubasi selama 7 hari dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm, pada suhu kamar. Biakan kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 2 ml dan ditambah 1 ml pereaksi *Salkowsky* [13], didiamkan selama 1 jam. Warna *pink* yang terbentuk diukur absorbansinya pada alat spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Kadar AIA dihitung setelah dibandingkan dengan absorbansi larutan standar AIA murni ( $\mu\text{g/ml}$ ).

#### Uji viabilitas dan stabilitas mikroba dalam bahan pembawa kompos iradiasi

Isolat terpilih masing-masing dengan konsentrasi  $10^{12}$  sel/ml dalam medium *Tryptic Soy Broth (TSB)*. Sebanyak 1 ml diinokulasikan pada sachet yang berisi 9 g bahan pembawa berbasis vermikompos yang telah disterilkan dengan iradiasi 25 kGy, kemudian disimpan selama 3 bulan. Tiap bulan dilakukan pengamatan viabilitas mikroba dalam bahan pembawa. Sebanyak 1 ginokulan dimasukkan dalam larutan NaCl 0,85% steril pada tabung reaksi sebagai pengenceran pertama ( $10^{-1}$ ). Selanjutnya diambil 100  $\mu\text{l}$  dimasukkan kedalam 900  $\mu\text{l}$  larutan NaCl 0,85% dalam seri pengenceran sampai  $10^{-11}$ . Dari pengenceran terakhir diambil 0,1 ml kemudian ditanam dalam media *TSA* dalam cawan petri, dan diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri dihitung dengan metode *plate count*.

#### Uji efektivitas inokulan isolat terpilih

Pengujian efektivitas isolat terpilih sebagai inokulan dalam bahan pembawa vermikompos yang telah disterilkan dengan iradiasi dilakukan pada tanaman jagung dalam pot. Dosis perlakuan yang diberikan adalah sebesar 1 g bahan pembawa/pot atau setara dengan  $10^{12}$  cfu/g. Sebagai kontrol

positif digunakan tanah yang mengandung pupuk 50% kompos + 50% NPK. Pengamatan pertumbuhan tanaman meliputi tinggi dan bobot kering biomassa tanaman pada 35 hari setelah tanam.

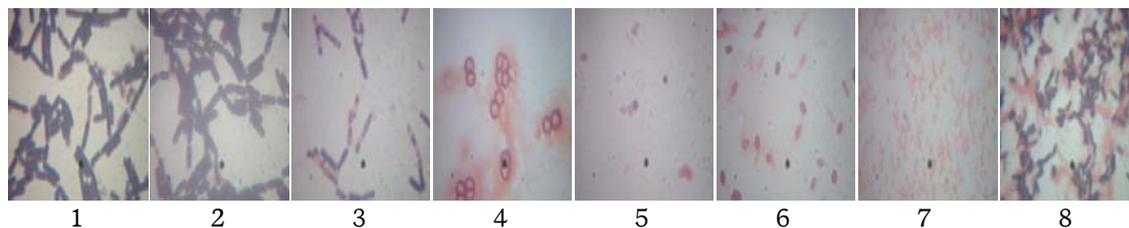
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi mikroba rizosfer dilakukan dari 48 contoh tanah dalam bentuk tanah rizosfer disekitar perakaran tanaman rerumputan (*Gramineae*), yaitu jagung (*Zea mays*), tebu (*Saccharum officinarum*), rumput gajah (*Pennisetum purpureum*). Jumlah isolat yang diperoleh sebanyak 116 isolat (Tabel 1). Rizosfer merupakan daerah yang ideal bagi tumbuh dan berkembangnya mikroba tanah. Keadaan ini didukung oleh fungsinya, yaitu sebagai penyedia nutrisi dan juga sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme. Beberapa macam nutrisi disekresikan di dalam rizosfer, yang sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan di dalam tanah. Beberapa bakteri penyedia hara yang terdapat pada rizosfer akar disebut sebagai rhizobakteri pemacu tanaman atau dikenal sebagai *PGPR*. *PGPR* dibagi menjadi dua kelompok yaitu berperan dalam siklus nutrisi dan sebagai biokontrol patogen tanaman [14]. Intesitas interaksi yang besar antara rizobakteria dan akar tanaman berada pada jarak satu cm dari permukaan akar [15]. Dari hasil seleksi dan identifikasi meliputi uji morfologi dan pewarnaan Gram, biokimiawi diperoleh 8 isolat bakteri yang menunjukkan morfologi yang berbeda, yaitu bentuk koloni bundar, berwarna putih, krem dan bening, serta memiliki elevasi yang cembung dan datar.

Hasil pewarnaan Gram memperlihatkan sel berbentuk batang (basil) dan bulat (kokus), ada yang bersifat Gram positif dan negatif (Gambar 1). Berdasarkan pada pedoman identifikasi bakteri [9], delapan (8) isolat terpilih tersebut masing-masing menunjukkan strain *Bacillus circulans* (3 isolat) dengan kode BD2, KLB5, dan WNS3. *Azotobacter* sp (3 isolat) dengan kode KDB2, AZT4, dan KLAZ3, *Bacillus*

**Tabel 1.** Hasil Isolasi Mikroba Rizosfer dari Beberapa Daerah di Jawa Barat dan Jawa Tengah

Asal Contoh Rizosfer	pH Tanah	Jumlah Contoh	Jumlah Isolat
<u>Wilayah Jawa Barat:</u>			
Kedungbadak (Bogor)	5,1	6	21
Cilendek (Bogor)	5,3	4	15
Ciampea (Bogor)	4,7	5	10
Cimahpar (Bogor)	5,2	5	12
Sindang Barang (Bogor)	5,3	4	8
<u>Wilayah Jawa Tengah:</u>			
Wedas Lintang (Wonosobo)	5,0	5	20
Dieng (Wonosobo)	4,8	6	18
<u>Daerah Istimewa Yogyakarta:</u>			
Bantul	5,2	8	21
Sleman	5,8	6	18
<b>Jumlah</b>		<b>48</b>	<b>116</b>



**Gambar 1.** Hasil pewarnaan Gram dari isolat bakteri terpilih yang diisolasi pada daerah rizosfer

Keterangan :

1. *Bacillus circulans* (BD2);
2. *Bacillus circulans* (KLB5);
3. *Bacillus circulans* (WNS3);
4. *Azotobacter* sp (KDB2);
5. *Azotobacter* sp (AZT4);
6. *Azotobacter* sp (KLAZ3);
7. *Pseudomonas diminuta* (KACI);
8. *Bacillus stearothermophilus* (KLBN1).

*Stearothermophilus* (kode KLBN1), dan *Pseudomonas diminuta* (kode KACI).

Seleksi berdasarkan kemampuan melarutkan fosfat, dari 8 isolat terpilih, dilakukan uji pembentukan daerah bening (holozone) pada medium *Pikovskaya* agar. Daerah bening (holozone) disekitar koloni isolat, merupakan ciri dari adanya aktivitas mikroba pelarut fosfat dalam melarutkan P terikat dalam bentuk tri kalsium fosfat  $Ca_3(PO_4)_2$ . Seperti terlihat pada Gambar 2. Diameter (cm) dari 8 isolat bakteri terpilih,

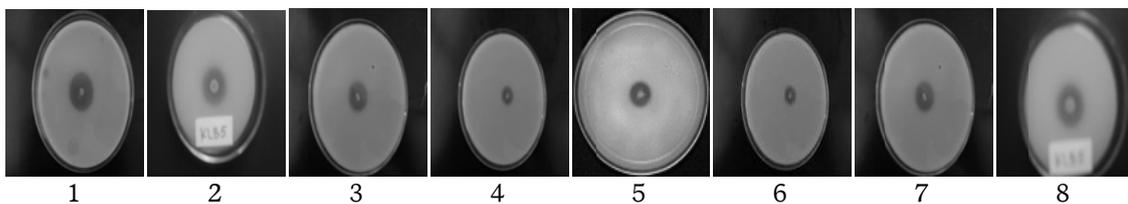
semuanya menunjukkan kemampuan dalam melarutkan P terikat yang ada didalam media *Pikovskaya* padat. Dari delapan isolat terpilih yang mempunyai diameter holozone terbesar adalah isolat KLB5 (*Bacillus circulans*) yaitu 1,34 cm sedangkan yang terkecil adalah Isolat KLAz3 (*Azotobacter* Sp) sebesar 0,61 cm. Menurut Sundara Rao [16], genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* memiliki kemampuan yang paling besar dalam melarutkan fosfat tak larut menjadi bentuk larut dalam tanah. Pelarutan ini disebabkan

oleh adanya sekresi asam organik bakteri tersebut seperti asam formiat, asetat, propionat, laktat, glikolat, glioksilat, fumarat, tartat, ketobutirat, suksinat dan sitrat. Jumlah P terlarut dan perubahan pH dalam medium *Pikovskaya* cair selama 8 hari rata-rata memperlihatkan adanya aktivitas bakteri pelarut fosfat yang cukup signifikan dalam melarutkan unsur P dari  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Pelarutan P tertinggi ditunjukkan oleh isolat *Bacillus circulan* (BD2) yaitu sebesar 91,21 mg/l. Meningkatnya pelarutan fosfat ternyata pH semakin menurun. Hal ini disebabkan adanya proses pembebasan asam organik seperti tersebut diatas yang berakibat pada terjadinya pelarutan Ca-fosfat.

Perbedaan kemampuan melarutkan fosfat dari spesies yang sama pada beberapa isolat *Bacillus circulan* kemungkinan disebabkan oleh perbedaan daya sekresi

asam-asam organik yang dan produksi enzim fosfatase yang dihasilkan isolat-isolat tersebut [17].

Hasil pengukuran fiksasi  $\text{N}_2$  dari 8 isolat terpilih dengan metode ARA menunjukkan kemampuan dari tiap-tiap isolat dalam mereduksi asetilena (menambat  $\text{N}_2$ ) berbeda-beda seperti terlihat pada Tabel 4. Nilai ARA yang tertinggi diperoleh dari isolat *Azotobacter sp* (KDB2) sebesar 235,05 nmol  $\text{C}_2\text{H}_2$  ml/jam. Bakteri penambat  $\text{N}_2$  Pada rizosfer *graminae*, seperti *Azotobacter sp*, termasuk salah satu kelompok bakteri aerobik yang mengkolonisasi permukaan akar. *Azotobacter* merupakan bakteri penambat  $\text{N}_2$  yang mampu menghasilkan substansi zat pemacu tumbuh giberelin, sitokinin, dan asam indol asetat, sehingga pemanfaatannya dapat memacu pertumbuhan akar [18].



**Gambar 2.** Hasil uji kelarutan fosfat melalui pembentukan zona bening (*holozone*) pada medium agar *Pikovskaya* dari delapan isolat bakteri rizosfer terpilih.

Keterangan :

1. *Bacillus circulan* (BD2); 2. *Bacillus Circulan* (KLB5); 3. *Bacillus Circulan* (WNS3);
4. *Azotobacter sp* (KDB2); 5. *Azotobacter sp* (AZT4); 6. *Azotobacter sp* (KLAZ3);
7. *Bacillus stearothermophilus* (KLBN1); 8. *Pseudomonas diminuta* (KACI).

**Tabel 2.** Ukuran Zona Bening kelarutan fosfat (P) dalam media *Pikovskaya* agar dari isolat mikroba rizosfer terpilih

No	Nama Isolat/Kode	Strain/Galur	Ukuran zona bening (cm)
1	Isolat BD2	<i>Bacillus circulan</i>	1,32
2	Isolat KLB5	<i>Bacillus circulan</i>	1,34
3	Isolat WNS3	<i>Bacillus circulan</i>	1,20
4	Isolat KDB2	<i>Azotobacter sp</i>	1,12
5	Isolat AZT4	<i>Azotobacter sp</i>	1,00
6	Isolat KLAZ3	<i>Azotobacter sp</i>	0,61
7	Isolat KACI	<i>Pseudomonas diminuta</i>	1,27
8	Isolat KLBN1	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0,80

Hasil Pengukuran kadar Asam Indol Asetat (AIA) secara *in vitro* dari delapan (8) isolat terpilih menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi hormon tertinggi diperoleh pada inkubasi hari ke-8. Konsentrasi AIA tertinggi pada pengamatan hari ke-2, 4 dan 8 masing-masing dihasilkan isolat *Azotobacter* sp (KDB2) dan *Bacillus circulans* (KLB5) yaitu sebesar 70,11 µg/ml, dan 67,86 µg/ml. (Tabel

5). Hasil yang diperoleh masih lebih rendah dengan hasil penelitian Patil [19], Isolat *Azotobacter* sp yang diisolasi dari daerah rizosfer menghasilkan hormon tertinggi sebesar 320 µg/ml setelah diinkubasi selama 6 hari. Beberapa spesies bakteri dari genus *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* dan *Klebsiella* diketahui memiliki potensi menghasilkan hormon AIA [20]. Hasil

**Tabel 3.** Uji Kelarutan fosfat (P) dalam media *Pikosvkaya* cair dari isolat mikroba rizosfer terpilih

Kode Isolat/Strain	Lama Inkubasi (hari)			
	2	4	6	8
	pH P terlarut (mg/l)	pH P terlarut (mg/l)	pH P terlarut (mg/l)	pH P terlarut (mg/l)
1. BD2/ <i>Bacillus circulans</i>	5,7 67,30	5,2 78,20	4,8 88,00	4,5 91,21
2. KLB5/ <i>Bacillus circulans</i>	5,4 67,50	5,0 76,51	4,5 81,10	4,2 88,81
3. WNS3/ <i>Bacillus circulans</i>	5,8 58,21	5,5 61,54	4,8 76,00	4,6 84,53
4. KDB2/ <i>Azotobacter</i> Sp	6,0 28,43	5,5 25,33	5,2 27,32	4,8 41,00
5. AZT4/ <i>Azotobacter</i> . Sp	6,2 35,44	6,0 42,44	5,4 49,00	5,3 56,44
6. KLAZ3/ <i>Azotobacter</i> Sp	6,0 25,22	5,5 33,41	5,2 34,42	5,0 39,00
7. KAC1/ <i>Pseudomonas diminuta</i>	5,6 62,42	5,0 70,11	4,4 77,11	4,3 83,12
8. KLBN1/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,2 55,31	6,0 60,32	5,5 77,40	5,0 90,50

**Tabel 4.** Kemampuan fiksasi N<sub>2</sub> isolat terpilih mikroba rizosfer berdasarkan uji ARA

No	Kode Isolat/strain	Kepekatan (cfu/ml)	Konsentrasi Etilen (nmol C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ml/jam)
1.	BD2/ <i>Bacillus circulans</i>	2,3 x 10 <sup>11</sup>	178,00
2.	KLB5/ <i>Bacillus circulans</i>	3,1 x 10 <sup>11</sup>	172,75
3.	WNS3/ <i>Bacillus circulans</i>	1,3 x 10 <sup>11</sup>	165,21
4.	KDB2/ <i>Azotobacter</i> .Sp	2,4 x 10 <sup>11</sup>	235,05
5.	AZT4/ <i>Azotobacter</i> . Sp	2,8 x 10 <sup>11</sup>	203,00
6.	KLAZ3/ <i>Azotobacter</i> Sp	2,6 x 10 <sup>11</sup>	175,50
7.	KAC1/ <i>Pseudomonas diminuta</i>	2,4 x 10 <sup>11</sup>	107,00
8.	KLBN1/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	3,6 x 10 <sup>11</sup>	171.20

penelitian Triplett [21], menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumonia* mampu memfiksasi nitrogen dan memacu pertumbuhan tanaman gandum. Hasil analisa lainnya, menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* memiliki potensi dalam menghasilkan hormon AIA [22].

penyimpanan hingga bulan ke-3 dibandingkan dengan isolat-isolat lainnya. Populasi kultur awal isolat *Bacillus circulan* BD2 dan *Azotobacter* KDB2 yang diinokulasi pada bahan pembawa kompos iradiasi masing-masing sebesar  $84 \times 10^{12}$  dan  $70 \times 10^{12}$  cfu/gram menjadi  $93 \times 10^{12}$  dan  $93 \times$

**Tabel 5.** Kandungan Hormon Pertumbuhan Asam Indol Asetat (AIA) Isolat Bakteri Rizosfer Terpilih

Kode Isolat/Strain	Konsentrasi AIA ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Hari ke-2	Hari ke- 4	Hari ke- 8
1 BD2/ <i>Bacillus circulan</i>	50,04	48,40	41,10
2 KLB5/ <i>Bacillus circulan</i>	57,08	64,50	67,86
3 WNS3/ <i>Bacillus circulan</i>	43,14	45,00	48,11
4 KDB2/ <i>Azotobacter. Sp</i>	53,00	56,04	70,11
5 AZT4/ <i>Azotobacter. Sp</i>	40,78	57,12	63,11
6 KLAZ3/ <i>Azotobacter Sp</i>	47,00	54,20	55,00
7 KAC1/ <i>Pseudomonas diminuta</i>	43, 23	43,41	74, 34
8 KLBN1/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	53,05	57,42	55,43

Delapan isolat terpilih yang diinokulasikan dalam bahan pembawa (*carrier*) kompos iradiasi dan disimpan pada suhu ruang memiliki viabilitas yang cukup baik hingga bulan ke-3. Populasi awal kultur isolat-isolat tersebut berkisar  $32 \times 10^{12}$ - $90 \times 10^{12}$  colony forming unit (cfu) per gram bahan pembawa. Setelah penyimpanan, populasi kultur isolat tersebut stabil maupun sedikit menurun pada kisaran  $18 \times 10^{12}$ - $93 \times 10^{12}$  cfu per gram (Tabel 6). Kultur isolat *Bacillus circulans* (BD2) dan Isolat *Azotobacter* KDB2 memiliki viabilitas yang paling baik pada bahan pembawa kompos iradiasi setelah

$10^{12}$  cfu per gram. Kultur isolat *Azotobacter* KLAZ3 merupakan kultur isolat yang mengalami penurunan populasi yang paling banyak dari populasi awal sebesar  $58 \times 10^{12}$  cfu/g menjadi  $28 \times 10^{12}$  cfu/g. Hasil tersebut menggambarkan isolat bakteri mampu bertahan hidup pada media bahan pembawa kompos iradiasi.

Hasil pengujian efektivitas dari delapan (8) isolat terhadap tanaman jagung (Tabel 7) menunjukkan bahwa inokulan yang mengandung isolat *Azotobacter* sp (KDB2) adalah yang terbaik dalam memacu pertumbuhan jagung. Hal ini terlihat pada

**Tabel 6.** Viabilitas isolat rizosfer selama penyimpanan dalam bahan pembawa kompos iradiasi

No	Nama Isolat	Viabilitas (cfu/gr)		
		0 hari	1 bulan	3 bulan
1	<i>Bacillus circulan</i> (BD2)	$84 \times 10^{12}$	$68 \times 10^{12}$	$93 \times 10^{12}$
2	<i>Bacillus circulan</i> (KLB5)	$95 \times 10^{12}$	$60 \times 10^{12}$	$75 \times 10^{12}$
3	<i>Bacillus circulan</i> (WNS3)	$94 \times 10^{12}$	$70 \times 10^{12}$	$64 \times 10^{12}$
4	<i>Azotobacter sp</i> (KDB2)	$70 \times 10^{12}$	$78 \times 10^{12}$	$84 \times 10^{12}$
5	<i>Azotobacter sp</i> (AZT4)	$69 \times 10^{12}$	$62 \times 10^{12}$	$59 \times 10^{12}$
6	<i>Azotobacter sp</i> (KLAZ3)	$58 \times 10^{12}$	$31 \times 10^{12}$	$28 \times 10^{12}$
7	<i>Pseudomonas diminuta</i> (KACI)	$90 \times 10^{12}$	$94 \times 10^{12}$	$91 \times 10^{12}$
8	<i>Bacillus tearothermophilus</i> (KLBN1)	$32 \times 10^{12}$	$12 \times 10^{12}$	$18 \times 10^{12}$

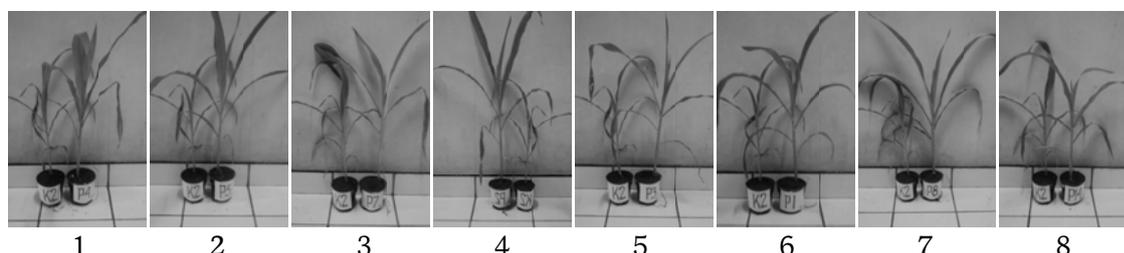
kenaikan tinggi tanaman dan bobot biomasa basah yang secara statistik berbeda nyata dengan kontrol negatif (tanpa inokulasi dan pupuk) dan kontrol positif (50% komposdan 50% NPK). Persentasi kenaikan tinggi

tanaman per pot (cm) sebesar 70,64% dibandingkan dengan tanaman kontrol negatif dan 37.61% dibandingkan dengan tanaman kontrol positif. Sedangkan persentasi kenaikan berat biomasa tanaman

**Tabel 7.** Nilai Rata-rata Tinggi dan berat biomasa basah Tanaman Jagung Umur 35 hari yang diinokulasi dengan isolat terpilih

No	Inokulan	Tinggi (cm)	Berat Biomassa (gr)
1	Tanpa pupuk (kontrol)	54,50 ± 2,12 a	2.28 ± 0,45 a
2	50% NPK + 50% Kompos	72.50 ± 7,78 bc	10.16 ± 0,89 b
3	<i>Bacillus circulans</i> (BD2)	83.50 ± 0,71 d	12.60 ± 0,014 c
4	<i>Bacillus circulans</i> (KLB5)	82.14 ± 6,36 de	10.60 ± 0,028 b
5	<i>Bacillus circulans</i> (WNS3)	83.50 ± 3,54 cd	12,60 ± 0,07 c
6	<i>Azotobacter</i> sp (KDB2)	93,00 ± 1,41 e	24.14 ± 0,014 f
7	<i>Azotobacter</i> sp(KIAz3)	80.50 ± 0,71 c	18,29 ± 0,06 d
8	<i>Azotobacter</i> sp (AZT4)	85.00 ± 1,41 d	22.22 ± 0,49 e
9	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (KLBNI)	86.50 ± 4,95 d	22,16 ± 0,028 e
10	<i>Pseudomonasdiminuta</i> (KACI)	72.00 ± 5,66 b	12,65 ± 0,098 c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.



**Gambar 3.** Pengaruh inokulan mikroba rizosfer terhadap pertumbuhan jagung setelah 35 hari setelah tanam (HST).

Keterangan :

1. Tanaman jagung P4 yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus circulan* (BD2) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (K2).
2. Tanaman jagung P5 yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus circulan* (KLB5) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (K2).
3. Tanaman jagung P7 yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus circulan* (WNS3) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (Kontrol) (K2).
4. Tanaman jagung P2 yang diberi inokulan dengan isolat *Azotobacter* sp (KDB2) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (K2).
5. Tanaman jagung P3 yang diberi inokulan dengan isolat *Azotobacter* sp (KLAZ3) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (Kontrol) (K2).
6. Tanaman jagung P1 yang diberi inokulan dengan isolat *Azotobacter* sp (AZT4) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (Kontrol) (K2).
7. Tanaman jagung P8 yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus stearothermophilus* (KLBNI) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (Kontrol) (K2).
8. Tanaman jagung P14 yang diberi inokulan dengan isolat *Pseudomonas diminuta* (KACI) dan yang diberi 50% kompos + 50% NPK (Kontrol) (K2).

(gr) sebesar 90,55% bila dibandingkan dengan kontrol negatif dan 57,60% dibandingkan dengan kontrol positif. Perbedaan ini dapat dilihat juga pada Gambar 3. Dari hasil percobaan ini terlihat bahwa inokulan kompos iradiasi dengan isolat tunggal jenis *Azotobacter* sp KDB2 efektif mampu memacu pertumbuhan tanaman jagung. Isolat *Azotobacter* sp KDB2 mempunyai peran ganda selain mempunyai kemampuan fiksasi Nitrogen yang baik, juga dapat menghasilkan zat pengatur tumbuh, seperti Indol Asam Asetat (AIA) yang tinggi. Fungsi ganda ini memberi keuntungan dalam pemanfaatan rizobakteri ini sebagai agen pemacu tumbuh tanaman.

Perlu pengembangan lebih lanjut, pembuatan inokulan berbasis kompos iradiasi yang mengandung bioaktif dengan formulasi konsorsia isolat mikroba rizosfer yang berbeda, sehingga efektivitasnya lebih baik untuk meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman.

## KESIMPULAN

Hasil Isolasi mikroba rizosfer didapatkan delapan (8) isolat potensial. Berdasarkan hasil identifikasi sampai tingkat spesies, maka kedelapan isolat itu masing-masing menunjukkan strain *Bacillus circulans* (3 isolat) dengan kode BD2, KLB5, dan WNS3, *Azotobacter* sp (3 isolat) dengan kode KDB2, KLAz3, dan AZT4, *Bacillus stearothermophilus* dengan kode KLBN1, dan *Pseudomonas diminuta* dengan kode KACI. Kemampuan pelarutan fosfat yang tertinggi diperoleh isolat BD2 (*Bacillus circulans*) yaitu sebesar 91,21 mg/l dengan ukuran zona bening dalam medium *Pikovskaya* 1,32 cm. Kemampuan produksi hormon AIA yang paling tinggi dicapai isolat *pseudomonas diminuta* (kode KACI) yaitu sebesar 74,34 µg/ml, sedangkan Kemampuan fiksasi N<sub>2</sub> tertinggi dicapai isolat *Azotobacter* sp (kode KDB2) yaitu sebesar 235,05 nmol/jam. Hasil uji viabilitas isolat terpilih dalam bahan pembawa kompos iradiasi, menunjukkan kestabilan meskipun mengalami sedikit

penurunan setelah penyimpanan selama 3 bulan. Hasil uji efektivitas inokulan terhadap tanaman jagung pot menunjukkan, isolat mampu meningkatkan pertumbuhan dibanding kontrol negatif dan positif. Inokulan yang mengandung isolat *Azotobacter* KDB2 merupakan inokulan terbaik sebagai bahan aktif Pupuk Organik Hayati (POH).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Sdr. Marwadi yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. GLICK, BR, The enhancement of plant growth by free living bacteria, J. Microbiol 41:109-114. (1995).
2. CATTELAN, A.J., P.G. HARTEL and J.J. FUHRMANN. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil. Sci. Soc. Am. J. 63: 1.670-1.680 (1999).
3. CUNINGHAM, J.E. and C. KUIAK., Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *penicillium billai*. App. Environ. Microbiol. 58:1451-1458 (1992).
4. WEDHASTRI, S. Isolasi dan seleksi *Azotobacter* spp. penghasil faktor tumbuh dan Penambat nitrogen dari tanah masam. Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan. 3:45-51 (2002).
5. FAHRUR RAZIE dan ISWANDI ANAS. Potensi *Azotobacter* Spp (dari Lahan Pasang Surut Kalimantan) Dalam Menghasilkan *Indole Acetic Acid (IAA)*. Jurnal Tanah dan Lingkungan, Vol. 7 No. 1 April 2005, 35-39 (2005).

6. SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. Methods in legume *Rhizobium* technology. Hawaii: Niftal Project; Mircen, 367p (1985).
7. SUBHA RAO, N.S. Biofertilizer in Agriculture. Oxford and IBH Publishing. (1982).
8. NANA MULYANA dan DADANG SUDRAJAT. Formulasi Konsorsia Mikroba Rizosfer untuk Meningkatkan Pertumbuhan dan Produktivitas Tanaman Jagung Manis (*Zea mays Sachararata* Sturt) (Belum dipublikasikan) (2010).
9. D.H. BERGEYS and JOHN G. HOLT. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore USA (1994).
10. GAUR, A.C. Phosphomicroorganisms and varians transformation incompost technology. FAO Project Field document No.13 Rome (1992).
11. TURNER G.I and A.H. GIBSON. *Measurement of nitrogen fixation by indirect means*. In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. F.J. Bergensen (Ed.) John Wiley & Sons, Inc. New York (1980).
12. BRICC, J.M. and SILVERSTONE, S.E. Rapid In Situ Assay for Indole Acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57. No. 2 : 535-538 (1991).
13. GORDON A.S. & WEBER R.P. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant. Physiol. 26: 192-195 (1951).
14. BASHAN, and HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth Promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. Soi Biol Biochem 30: (8, 9):1225-1228. (1998). <http://periodicals.faqs.org/201003/2013071231.html#ixzz1eP1t03X0>.
15. TATE, R.L. Soil Microbiology, p. 149-152. John Wiley & Sons, Inc. New York (2000).
16. SUNDARA, W.V.B. and SINHA, M.K., Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian J. Agric. Sci.*, **33**, 272-278 (1963).
17. GOENADI, DH, R. SARASWATI, dan Y. LESTARI. Kemampuan melarutkan fosfat dari beberapa isolat bakteri asal tanah dan pupuk kandang sapi. Menara Perkebunan 61 (2): 44-49 (1993).
18. ALEXANDER M. Introduction to Soil microbiology. John Wiley & Sons, New York. 333-349 (1997).
19. ROASENBLUETH, M dan MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interaction with host. The American Phytopathological Society. MPMI Vol. 19, No. 8: 827-837 (2006).
20. PATIL, V. Production of Indole Acetic Acid by *Azotobacter* sp. Recent Research In Science and Technology 3 (12): 14-16 (2011).
21. TRIPLET, E.W. Nitrogen Fixation in Wheat by *Klebsiella pneumonia*. 342 (2006). <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/204253.html>.
22. PATTEN, C., and GLICK, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the hostplant root system. Applied and Environmental Microbiology 68, 3795-3801 (2002).