

Eksplorasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Penghasil IAA dan Pelarut Fosfat Asal Rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu, Jawa Timur

Ratna Fadhilah Israwan¹⁾, Tri Ardyati²⁾, Suharjono³⁾

^{1,2,3)} Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

¹⁾ratna.fadhilah@gmail.com, ²⁾tri_ardiyati@yahoo.com dan ³⁾calitus@ub.ac.id

ABSTRAK

Biofertilizer adalah pupuk yang mengandung mikroba dan mikroba tersebut membantu penyediaan nutrisi dalam tanah sehingga dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman. Bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik telah banyak digunakan sebagai agen biofertilizer. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui isolat bakteri asal rhizosfer Tanaman Apel, Kota Batu, Jawa Timur yang memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen, menghasilkan IAA serta melarutkan fosfat. Isolasi dilakukan dengan pengenceran menggunakan sampel tanah rhizosfer tanaman Apel. Kemampuan fiksasi nitrogen menggunakan media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (Nfb) yang diperkaya triptofan dan kit *visocolour alpha ammonium*. Produksi IAA oleh bakteri secara kualitatif dan kuantitatif pada media *Luria Bertani* diperkaya triptofan serta reagen Salkowski. Deteksi pelarutan fosfat dilakukan menggunakan media *Pikovskaya* dan reagen *Mo-Blue*. Empat isolat diisolasi dari rhizosfer tanaman Apel (isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5), semuanya memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen dan menghasilkan IAA. Isolat TR5 tertinggi dalam memfiksasi nitrogen sebesar 1 mg/L. Isolat TR1 tertinggi dalam menghasilkan IAA yakni pada jam ke-48 sebesar 793,55 µg/mL. Sedangkan Isolat TR4 melarutkan fosfat tertinggi sebesar 31,28 ppm dengan indeks pelarutan fosfat sebesar 1,21. Ketiga isolat TR1, TR4 dan TR5 berpotensi sebagai agen *biofertilizer*.

Kata kunci : *Biofertilizer*, fiksasi nitrogen, fosfat, IAA, rhizosfer

ABSTRACT

Biofertilizer is fertilizer contain microbes that help provide available nutrients for plants. Non symbiotic nitrogen fixing bacteria has been widely utilized as a biofertilizer agent. The objective of this research was to explore bacteria have ability in fixing nitrogen, producing IAA (*indole acetic acid*) and solubilizing phosphate from rhizosfer of Apple tree in Batu City, East Java. Isolation of soil sample from Apple tree rhizosphere was carried out using serial dilution. Nitrogen fixation ability was assayed qualitatively using nitrogen free bromothymol blue (Nfb) medium enriched with tryptophan. Quantitative measurement of Nitrogen fixation was done by Visocolour ammonium alpha detection kit. IAA production was observed in Luria Bertani medium enriched with tryptophan and Salkowski reagent. Detection of phosphate solubilization was done using Pikovskaya agar and Mo-blue reagent. Four isolates were obtained, isolates TR1, TR2, TR4 and TR5. All isolates have ability to fix nitrogen and to produce IAA. Isolate TR5 has the highest ability of nitrogen fixing (1 mg/L). Isolate TR1 produce maximum IAA concentration (793,55 µg/mL) at 48 hours. Isolate TR4 has the highest ability to solubilize phosphate (31,28 ppm) with index of phosphate solubilization 1,21. Isolate TR1, TR4 and TR5 are potential as biofertilizer agents.

Keywords: *Biofertilizer*, IAA, nitrogen fixation, phosphate, rhizosphere

PENDAHULUAN

Apel menjadi produk pertanian unggulan dari Kota Batu, Jawa Timur. Namun akibat hama penyakit dan berkurangnya bahan organik tanah di perkebunan Apel mengakibatkan penurunan

produksi Apel Batu. Maka solusi untuk memperbaiki ketersediaan bahan organik tanah adalah dengan penggunaan *biofertilizer*. *Biofertilizer* adalah pupuk yang mengandung

mikroba dan mikroba tersebut membantu penyediaan nutrisi dalam tanah sehingga dapat dimanfaatkan secara langsung oleh tanaman [1]. Mikroba yang berpotensi sebagai agen *biofertilizer* adalah bakteri pengikat nitrogen yang mampu menghasilkan IAA (*indole acetic acid*) dan melarutkan fosfat. Kombinasi dari bakteri tersebut akan menyediakan unsur hara penting hingga dapat diserap oleh tanaman dengan mudah.

Bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik merupakan bakteri yang mampu melakukan pengikatan atau fiksasi nitrogen tanpa melakukan simbiosis dengan tanaman. Nitrogen digunakan sebagai penyusun nukleotida dan nukleosida. Nitrogen merupakan nutrisi yang sedikit tersedia dalam tanah sehingga perlu adanya sumber nitrogen eksogen dari atmosfer [2]. Pemanfaatan bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik sebagai agen *biofertilizer* telah banyak dikembangkan dalam bidang pertanian. Penelitian ini akan menguji kemampuan bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik yang berasal dari rhizosfer tanaman Apel Kota Batu, Jawa timur yang berpotensi sebagai agen *biofertilizer* berdasarkan kemampuan fiksasi nitrogen, menghasilkan IAA dan pelarutan fosfat.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel tanah. Sampel tanah diambil dari rhizosfer tanaman Apel dari perkebunan Apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu, Jawa Timur. Rhizosfer merupakan tanah disekitar perakaran tanaman yang aktif. Sampel tanah diambil pada beberapa titik yang berbeda dengan metode komposit dan digunakan tanah sekitar perakaran tanaman yang aktif dari pertanian organik. Bersamaan dengan pengambilan sampel dilakukan pengukuran faktor fisik dan kimia tanah seperti temperatur tanah, ketinggian, letak koordinat, intensitas cahaya. Selain itu dilakukan pengukuran pH tanah, bahan organik dan kelembaban tanah di Laboratorium.

Isolasi bakteri. Sampel tanah seberat 25 gram dimasukkan dalam larutan garam fisiologis 225 ml. Dilakukan metode dilusi hingga seri pengenceran 10^{-6} . Selanjutnya dari masing-

masing pengenceran diinokulasikan secara aseptis pada media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (Nfb) semi solid yang diperkaya triptofan. Dilakukan inkubasi 5-6 hari dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru mengindikasikan adanya bakteri pemfiksasi nitrogen. Tabung dengan media yang berubah warna diinokulasikan pada media Nfb solid yang diperkaya triptofan dan *yeast extract*. Bakteri yang tumbuh dilakukan karakteristik morfologi. Bakteri dilakukan pemurnian dengan metode serial dilusi dan *spread plate*. Stok bakteri disimpan pada media *Nutrient agar* pada suhu -4°C .

Uji kuantitatif kemampuan fiksasi nitrogen. Bakteri ditumbuhkan pada media NFB *broth* selama 5-6 hari. Kultur dilakukan sentrifugasi Supernatan dilakukan uji dengan penambahan larutan pada *kit visocolor alpha ammonium*. Perubahan warna yang terjadi pada sampel menjadi acuan adanya kandungan unsur nitrogen dalam bentuk ammonium (NH_4^+).

Uji kualitatif kemampuan produksi IAA. Masing-masing isolat ditumbuhkan pada *Luria Bertani* (LB) *Broth* yang diperkaya triptofan. Kultur diinkubasi dan diambil 0,1 ml kemudian dilakukan *spread plate* pada LB *agar*. Setiap cawan yang telah diinokulasi dilapisi membran nitroselulosa dan diinkubasi hingga bakteri tumbuh. Lalu, membran direndam dalam reagen Salkowski. Membran yang berubah warna menjadi merah atau merah muda merupakan indikasi adanya IAA yang diproduksi bakteri.

Uji kuantitatif kemampuan produksi IAA. Masing-masing isolat ditumbuhkan pada LB *Broth* yang diperkaya triptofan dan Kultur diinkubasi. 1 % kultur isolat diinokulasikan pada media LB baru yang diperkaya triptofan. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C . *Sampling* dilakukan pada jam ke 0,24,48 dan 72. Kultur hasil *sampling* dilakukan sentrifugasi. Supernatan ditambahkan reagen Salkowski dan diinkubasi pada suhu ruang. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 530 nm. Jumlah IAA yang dihasilkan didapatkan dengan mengkonversi absorbansi pada regresi

kurva baku IAA. Kurva baku IAA dibuat dengan konsentrasi 10-70 µg/ml.

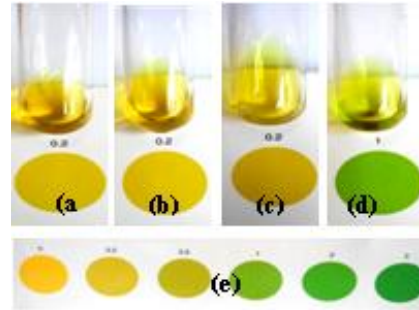
Uji kualitatif kemampuan pelarut fosfat. Masing-masing isolat diinokulasikan pada *Pikovskaya agar* (PKV) kemudian diinkubasi pada suhu 30°C. Isolat dikatakan dapat melarutkan fosfat apabila terdapat zona bening disekitar koloni. Lalu dilakukan penghitungan indeks zona bening yakni dengan rumus total diameter (zona bening) / diameter koloni.

Uji kuantitatif kemampuan pelarut fosfat. Masing-masing isolat ditumbuhkan pada PKV *broth* kemudian 0,2 ml kultur diinokulasikan pada media PKV *broth* baru dan diinkubasi. Kultur dilakukan filtrasi. Filtrat dilakukan sentrifugasi. Supernatan ditambahkan pereaksi P (reagen *Mo-blue*) dan diinkubasi. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 693 nm. Jumlah fosfat terlarut yang dihasilkan didapatkan dengan mengkonversi absorbansi pada regresi kurva baku fosfat (KH₂PO₄). Kurva baku fosfat dibuat dengan konsentrasi 0- 4,5 ppm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

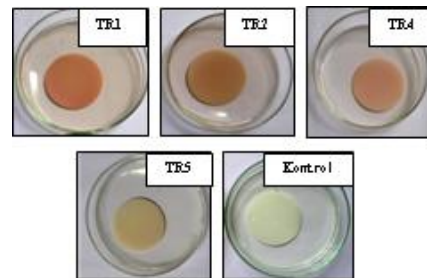
Isolasi dan Seleksi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen. Isolasi bakteri dari rhizosfer tanaman apel didapatkan 4 isolat yakni TR1, TR2, TR4 dan TR5. Pemilihan keempat isolat didasarkan pada perbedaan morfologi koloni. Perubahan warna pada media Nfb dikarenakan hadirnya NH₃ yang bersifat basa, menyebabkan indikator *bromothymol blue* berubah menjadi biru. Isolat kemudian dideteksi kemampuan fiksasi nitrogen menggunakan *kit visicolor alpha ammonium*. Isolat TR5 terdeteksi NH₄⁺ tertinggi yakni 1 mg/L. Kemudian sebesar 0,2 mg/L oleh isolat TR1, TR2 dan TR4. Proses fiksasi nitrogen oleh bakteri akan menghasilkan ammonia (NH₃) [3]. Kehadiran ion hidrogen akan membentuk ammonium (NH₄⁺) [4].

Ammonium yang terdeteksi oleh isolat tersebut dikatakan rendah apabila dibandingkan dengan *Alcaligenes* sp. yang terdeteksi ammonium sebesar 3 mg/L [5].



Gambar 1. Perubahan warna supernatan setelah ditetesi larutan kit (a) isolat TR1 (0,2 mg/L) (b) isolat TR2 (0,2 mg/L) (c) isolat TR4 (0,2 mg/L) (d) isolat TR5 (1 mg/L) (e) Spektrum warna *Kit Visicolor Alpha Ammonium* yang menunjukkan kadar NH₄⁺

Uji kualitatif kemampuan produksi IAA. Keempat isolat yang didapatkan diuji kemampuannya dalam menghasilkan IAA. Hasil yang didapatkan bahwa keempat isolat mampu menghasilkan IAA ditandai dengan terbentuknya warna merah pada membran nitroselulosa. Warna merah merupakan indikasi terdeteksinya indol dari IAA [6]. Semakin merah warna yang terbentuk maka semakin tinggi konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh bakteri.



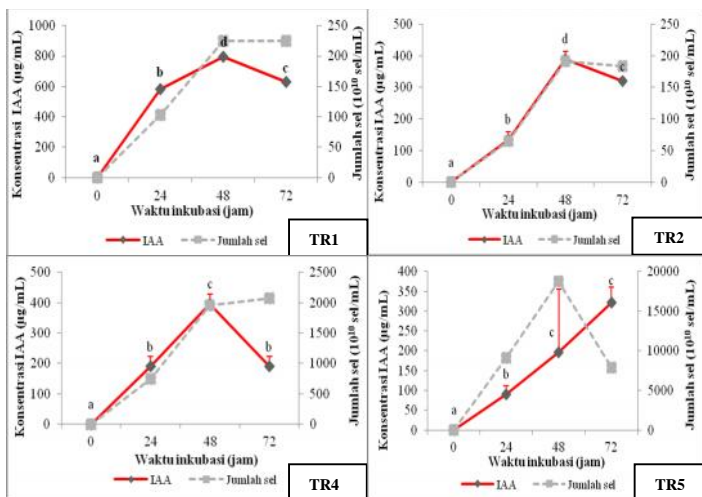
Gambar 2. Perubahan warna pada membran nitroselulosa yang mengandung masing-masing isolat setelah direndam dalam reagen Salkowski.

Uji kuantitatif kemampuan produksi IAA. Uji kuantitatif didasarkan pada isolat yang mampu memberikan warna merah pada membran nitroselulosa. Produksi IAA dihitung dengan satuan µg/ml. Hasil uji menunjukkan bahwa produksi IAA tertinggi dihasilkan oleh isolat TR1 yakni pada jam ke-48 sebesar 793,5 µg/ml dan berada pada fase stasioner. Isolat Isolat TR1, TR2, TR4 mengalami penurunan

jumlah IAA pada jam ke-72 yakni ketika bakteri berada pada fase akhir logaritmik atau stasioner. Namun isolat TR5 terus mengalami peningkatan konsentrasi IAA seiring bertambahnya jumlah sel. Bakteri menghasilkan IAA maksimal pada jam ke-24 atau 48 dan menurun pada jam ke-72. Hal tersebut diakibatkan karena pada jam tersebut bakteri berada pada fase akhir logaritmik sehingga kandungan enzim perubah triptofan menjadi IAA dihasilkan dalam jumlah banyak [7]. Konsentrasi IAA berlebih akan diregulasi bakteri dengan pembentukan IAA oksidase dan peroksidase [8].

dilanjutkan dengan penghitungan indeks pelarut fosfat dan penghitungan fosfat terlarut secara kolorimetrik. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat TR1, TR2 dan TR4 mampu menghasilkan zona bening dengan hasil tertinggi oleh isolat TR4 sebesar 1,21 dengan jumlah fosfat terlarut 31,28 ppm. Zona bening terbentuk akibat bakteri mampu memanfaatkan trikalsium fosfat ($Ca_3(PO_4)_3OH$) dalam media sebagai sumber fosfat [11].

Tabel 4. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Pelarutan Fosfat oleh Isolat Bakteri. Keterangan : perbedaan notasi menunjukkan beda nyata pada uji Anova ($\alpha=0,05$)



Gambar 3. Produksi IAA isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik penghasil IAA jam ke-0, 24,48 dan 72. Keterangan: perbedaan notasi menunjukkan beda nyata pada uji Anova ($\alpha=0,05$).

Produksi IAA yang meningkat ketika jumlah sel menurun diduga akibat adanya regulasi produksi IAA yang dipengaruhi oleh *stationary phase sigma factor RpoS* yakni gen yang meregulasi respon bakteri ketika dalam kondisi stress [9]. Penambahan triptofan diduga mampu meningkatkan jumlah IAA yang dihasilkan. Jumlah IAA yang dihasilkan isolat tersebut tinggi dibandingkan dengan *Pseudomonas fluorescens* dengan triptofan 100 µg/ml menghasilkan IAA 8 µg/ml [10].

Uji kemampuan pelarut fosfat. Isolat yang didapatkan dilakukan pengamatan kemampuan pelarutan fosfat yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni

Isolat	Kualitatif (Zona Bening)	Kuantitatif	
		Indeks pelarut fosfat	Fosfat terlarut (ppm)
TR1		1,12 ^a	28,44 ^B
TR2		1,09 ^a	23,98 ^A
TR4		1,21 ^a	31,28 ^C

Kemampuan pelarut fosfat oleh isolat tersebut dikatakan rendah apabila dibandingkan dengan *Bacillus sp. (S9)* mampu melarutkan fosfat sebesar 122,36 ppm dengan indeks pelarut fosfat sebesar 1,6 [12]. Semakin tinggi indeks pelarut fosfat semakin tinggi jumlah fosfat yang mampu dilarutkan. Pembentukan zona bening diakibatkan karena adanya enzim fosfatase yang dihasilkan bakteri [13]. Pelepasan fosfat berkaitan dengan terbentuknya asam organik oleh bakteri untuk melarutkan fosfat terikat dalam tanah. Sehingga fosfat akan terlepas dalam bentuk ion $H_2PO_4^-$ dan HPO_4^{2-} yang merupakan bentuk fosfat yang mampu diserap oleh tanaman [14].

KESIMPULAN

Terdapat empat isolat yang berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman Apel dan keempatnya yakni isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5 memiliki kemampuan dalam memfiksasi nitrogen dan menghasilkan IAA. Fiksasi nitrogen tertinggi oleh isolat TR5 (1mg/l). Produksi IAA tertinggi oleh isolat TR1 pada jam ke 48 yakni 793,55 µg/ml. Pelarutan fosfat tertinggi oleh isolat TR4 yakni sebesar 31,28 ppm.

Berkaitan dengan potensinya sebagai *biofertilizer* maka kemampuan keempat isolat dalam memfiksasi nitrogen, menghasilkan IAA dan melarutkan fosfat dipaparkan dalam tabel dibawah ini. Isolat yang paling berpotensi sebagai *biofertilizer* adalah TR1, TR4 dan TR5.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan kepada Dr. Suharjono, dalam proyek penelitian yang didanai oleh DPP/SPP, sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Tamil Nadu Agricultural University. 2008. Organic Farming : Biofertilizers Technology. http://agritech.tnau.ac.in/org_farm/orgfarm_biofertilizertechnology.html. Diakses 23 Desember 2014.
- [2] Dey, P.M dan Harborne, J.B. 1997. Plant Biochemistry. Academic Press. London
- [3] Sylvia, D. M, Fuhrmann, J.J, Hartel P.G dan Zuberer, D.A. 1999. *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- [4] Hidayat, A.T. 2009. Potensi Pelepasan N-NH₄⁺ dan N-NO₃⁻ Tanah andisol yang ditanami sayuran di daerah dataran tinggi. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [5] Latt, Z.K., Yu, S.S dan Lynn, T.M. 2013. Enhancement of Cellulolytic Nitrogen Fixing Activity of *Alcaligenes* sp. by MNNG Mutagenesis. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 4 (3): 979 - 986.
- [6] Singh, P. Kumar, V dan Agrawal, S. 2014. Evaluation of Phytase Producing Bacteria for Their Plant Growth Promoting Activities. <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2014/426483/>. Diakses 26 November 2014.
- [7] Andanawarih, S. 2008. Optimasi produksi Asam Indolasetat oleh *Rhizobium* sp. dalam medium serum lateks *hevea brasiliensis* dengan suplementasi triptofan. <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/18016/G08san.pdf?sequence=2>. Diakses 20 Desember 2014.
- [8] Datta C. dan Basu, P.S. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiology Research*. 155 :123-127.
- [9] Patten, C.L dan Glick, B.R, 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* Gr12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor Rpos. *Can J microbiol* 48 (7) :42-635.
- [10] Prakash, P. dan Karthikeyan, B. 2013. Isolation and Purification of Plant growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) from the Rhizosphere of *Acorus calamus* grown soil. *Indian Streams Research Journal*. 7 (3) : 1-11.
- [11] Thakuria, D., Talukdar, N.C, Goswami, C., Hazarika, S., Boro, R.C dan Khan, M.R. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*. 7 (86) : 978-985.
- [12] Tripti, Kumar, V. dan Anshumali. 2012. Phosphate Solubilizing Activity of Some Bacterial Strains Isolated from Chemical Pesticide Exposed Agriculture Soil. *International Journal of Engineering research and Development*. 3 (9) : 1-6.
- [13] Goldstein, A.H. 1995. Recent Progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*. 12 : 185-193.
- [15] Elfiati, D. 2005. Peranan Mikroba Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan Tanaman. <http://library.usu.ac.id/download/fp/hutan-deni%20elfiati.pdf>. Diakses 22 November 2014