

Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus* sp. Pelarut Fosfat dari Rhizosfer Tanaman Leguminosae

Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria Bacillus sp. from the Rhizosphere of Leguminosae Plants

Mukamto, Syazwani Ulfah, Weda Mahalina, Ahmad Syauqi, Laila Istiqfaroh, Guntur Trimulyono*

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya

Jln. Ketintang Surabaya 60231

ABSTRAK

Rhizosfer tanaman Leguminosae banyak ditumbuhi bakteri, salah satunya adalah genus *Bacillus* yang merupakan *Plant Growth Promoting Bacteria* yang bermanfaat bagi tumbuhan, di antaranya karena kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan isolat *Bacillus* sp. dari rhizosfer tanaman Leguminosae yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan isolasi bakteri, karakterisasi koloni, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, uji katalase, dan uji kelarutan fosfat. Metode isolasi yang digunakan dengan metode *pour plate* dan untuk pengujian bakteri pelarut fosfat menggunakan media Pikovskaya. Sebanyak 36 isolat *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dengan berbagai karakter koloni dan karakter sel berbentuk batang, Gram positif, membentuk endospora, dan memiliki katalase positif kecuali isolat BAP2 dan BAP5 yang memiliki katalase negatif. Sebanyak lima isolat *Bacillus* sp. (isolat BCP 2, BCP 4, BAC 2, BCM 3, dan BAP 1) diketahui mampu melarutkan fosfat dengan terbentuknya *holozone* di sekitar koloni setelah masa inkubasi tujuh hari.

Kata kunci: *Leguminosae*; *Bacillus* sp.; Media Pikovskaya; pelarut fosfat

ABSTRACT

Rhizosphere of Leguminosae is inhabited by bacteria, one of which is the genus Bacillus which is Plant Growth Promoting Bacteria that are beneficial to plants, such as its ability to dissolve phosphate. The purpose of this study was to obtain isolates of Bacillus sp. from the rhizosphere of Leguminosae plants which has the ability to dissolve phosphate. This study was conducted by bacterial isolation, characterization colonies, Gram staining, coloring endospores, catalase test, and solubility test phosphate. Isolation methods used by the pour plate method for testing bacteria and phosphate solvent using Pikovskaya media. A total of 36 isolates of Bacillus sp. successfully isolated colonies with different characters and character of rod-shaped cells, Gram-positive, form endospores, and has a positive catalase except isolates BAP2 and BAP5 which has a negative catalase. A total of five isolates of Bacillus sp. (Isolast BCP 2, BCP 4, BAC 2, 3 BCM, and BAP 1) known to be capable of dissolving phosphate holozone formation around the colonies after an incubation period of seven days.

Key words: *Leguminosae*; *Bacillus* sp.; *Pikovskaya Media*; *phosphate solubilizing bacteria*

PENDAHULUAN

Leguminosae merupakan nama botani untuk famili tanaman polong-polongan (Heyne, 1988). Tanaman Leguminosae memiliki banyak manfaat di antaranya sebagai sumber protein nabati (*Phaseolus*

spp., *Vicia faba*, *Vigna unguiculata*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Arachis hipogaea*, *Glicine max*); sebagai buah yang bisa dimakan (*Inga spp.*, *Tamarindus indica*); obat-obatan (*Physostigma venenosum*); insektisida (*Lonchocarpus*); untuk meningkatkan kesuburan tanah (*Trifolium*, *Medicago spp.*); untuk diambil

* Alamat Korespondensi:

surel: gtrimulyono@gmail.com

kayunya (*Robinia pseudoacacia*); sumber pewarna (*Indigofera tinctoria*, *Haematoxylum campechianum*). Tanaman Leguminosae mampu menghasilkan zat metabolit sekunder ketika dalam kondisi sel yang kekurangan nutrisi atau pertumbuhan suboptimal (Widayanti, 2007). Zat metabolit sekunder tersebut dikeluarkan pada organ akar sebagai zat eksudat. Luteolin (3,4,5,7-tetra hidroksiflavon) merupakan bahan kimia yang terkandung dalam zat eksudat yang dikeluarkan tumbuhan dan berperan dalam merangsang perkembangan bakteri. Di samping luteolin zat eksudat lain dapat berupa komponen aktif yaitu flavonoid (Subandi, 2010).

Berdasarkan hasil observasi yang dilakukan di sekitar Universitas Negeri Surabaya Kampus Ketintang, ditemukan 21 spesies tanaman Leguminosae, yaitu *Leucaena glauca*, *Mimosa diplotricha*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica*, *Mimosa invisa*, *Mimosa pigra*, *Adenanthera paronia*, *Delonix regia*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Crotalaria mucronata*, *Calopogonium mucunoides*, *Vigna sinensi*, *Erythrina fusca*, *Samanea saman*, *Pithecolobium saman*, *Arachis hypogaea*, *Cassia occidentalis*, *Cassia siamea*, *Cassia sarathensis*, *Sesbania grandiflora*, dan *Acacia auriculiformes*.

Rhizosfer merupakan daerah di dekat perakaran tanaman. Menurut Ferfinia (2010), pada tanah di daerah rhizosfer memiliki jumlah bakteri, cendawan, dan *Actinomyces* yang lebih banyak dibandingkan tanah tanpa sistem perakaran (tanpa rhizosfer). Beberapa genus bakteri yang dilaporkan melimpah jumlahnya di daerah rhizosfer adalah *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Mycobacter*, *Flavobacter*, *Cellulomonas*, *Micrococcus* dan *Bacillus*.

Bacillus sp. merupakan salah satu bakteri yang banyak ditemukan di daerah rhizosfer (Hatmanti, 2000; Astuti, 2008). Bakteri *Bacillus* sp. merupakan kelompok bakteri PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan fitohormon seperti seperti asam indol asetat, asam giberelin, sitokinin dan etilen, menghasilkan siderofor, pengikat nitrogen, penghasil antibakteri, antipatogen tanaman serta dapat melarutkan fosfat (Astuti, 2008). *Bacillus* sp. merupakan bakteri pelarut fosfat yang telah banyak diaplikasikan dalam memicu pertumbuhan tanaman. Bakteri ini di dalam tanah dapat melepaskan unsur P yang terikat menjadi bebas sehingga tersedia untuk kebutuhan tanaman. Fosfat secara mutlak diperlukan tanaman karena berperan dalam menyimpan dan mentransfer energi serta sebagai komponen protein dan asam nukleat (Silitonga *et al.*, 2011). Bakteri pelarut fosfat akan melepaskan fosfor dari ikatan Fe, Al, Ca dan Mg dengan jalan mensekresikan asam organik seperti asam format, asam asetat, asam propionat, asam laktat, asam glikolat, asam fumarat, dan asam suksinat (Pratiwi, 2008).

Rhizobakteri *Bacillus* sp. memberikan banyak manfaat tidak hanya bagi tanaman melainkan juga dalam bidang lain sehingga menarik untuk dikaji lebih lanjut. Melalui penelitian ini diharapkan dapat menemukan berbagai macam spesies *Bacillus* sp. yang dapat dimanfaatkan terutama dalam melarutkan fosfat sehingga dapat berperan untuk pertumbuhan tanaman. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi *Bacillus* sp. dari rhizosfer tanaman Leguminosae di sekitar Universitas Negeri Surabaya Kampus Ketintang yang memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan untuk diisolasi adalah sampel tanah dari rhizosfer tanaman Leguminosae yang ada di sekitar Universitas Negeri Surabaya Kampus Ketintang Surabaya. Sampel tanah rhizosfer yang digunakan berasal dari sembilan spesies anggota Leguminosae, yaitu *Mimosa diplotricha*, *Delonix regia*, *Crotalaria mucronata*, *Vigna sinensi*, *Pithecolobium saman*, *Arachis hypogaea*, *Cassia siamea*, *Sesbania grandiflora*, dan *Acacia auriculiformes*.

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Borth* (NB), media Pikovskaya dengan komposisi Glukosa 10 g, Ca_3HPO_4 5 g, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 0,5 g, KCL 0,2 g, MgSO_4 0,1 g dan $7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, ekstrak khamir 0,5 g, MnSO_4 25 mg, FeSO_4 25 mg dan agar *bacto* 20 g dalam 1 liter akuades (Astuti, 2008). Bahan yang digunakan untuk pewarnaan Gram meliputi *crystal violet*, iodine, safranin. Bahan untuk pewarnaan endospora berupa malakit hijau dan safranin. Untuk uji katalase menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%. Bahan lain yang digunakan adalah alkohol 95%, alkohol 70%, dan spiritus. Alat-alat yang digunakan selama penelitian adalah ose, tabung reaksi, cawan Petri, erlenmeyer, mikropipet, tip mikropipet, rak tabung reaksi, *object glass* dan *cover glass*, plastik *wrap*, kertas label, gunting, pembakar spiritus, oven, autoklaf, inkubator, *refrigerator*.

Tanah diambil dari daerah rhizosfer tanaman Leguminosae yang telah ditentukan. Tanah diambil pada kedalaman 5-10 cm kemudian dimasukkan ke dalam botol yang sudah disterilkan untuk dibawa ke laboratorium. Sampel tanah yang diperoleh di oven pada suhu 80°C selama 10-30 menit. Hal ini dilakukan menyeleksi *Bacillus* sp dari bakteri yang lainnya. Bakteri *Bacillus* sp. akan bertahan sedangkan bakteri yang lain akan mati (Astuti, 2008).

Isolasi *Bacillus* sp. menggunakan metode yang dilakukan oleh Astuti (2008). Sebanyak 1 gram sampel tanah dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl 0,85%. Sampel divorteks dan dipanaskan pada suhu 80 °C

selama 10 menit pada tekanan 1,02 atm, selanjutnya dilakukan pengenceran berseri sampai pengenceran 10^{-6} . Masing-masing sebanyak 100 μ l suspensi hasil pengenceran ditumbuhkan dengan *Pour Plate Method* menggunakan media NA. Penanaman bakteri dilakukan secara duplo. Hasil *pour plate* selanjutnya diinkubasi selama 24 jam (Astuti, 2008). Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan cara *streak plate* menggunakan media NA. Hasil pemurnian ditumbuhkan dalam tabung reaksi yang berisi media NA miring, diinkubasi selama 24 jam selanjutnya disimpan di *refrigerator* untuk stok isolat bakteri.

Isolat bakteri yang diperoleh dikarakterisasi morfologi koloninya. Karakterisasi juga dilakukan dengan uji biokimia meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, pewarnaan endospora

Uji kemampuan *Bacillus* sp. yang memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat dilakukan menggunakan media *Pikovskaya* dengan komposisi 10 g glukosa, 5 g Ca_3HPO_4 , 0,5 g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO_4 , 0,1 g $7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g ekstrak khamir, 25 mg MnSO_4 , 25 mg FeSO_4 25 dan 20 g agar *bacto* dalam 1 liter akuades (Astuti, 2008). Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media *Pikovskaya* dengan metode *steak plate* kemudian diinkubasi selama 7 hari. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui terbentuknya *Holozone* (zona bening) disekitar koloni bakteri yang menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut mampu melarutkan fosfat, demikian sebaliknya (Raharjo *et al.*, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi *Bacillus* sp. dari sembilan sampel tanah rhizosfer tanaman Leguminosae yang berada di sekitar Universitas Negeri Surabaya Kampus Ketintang berhasil mendapatkan sebanyak 36 isolat. Tujuh isolat *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dari

rhizosfer tanaman *Mimosa diplotricha* (isolat BMD 1, BMD 2, BMD 3, BMD 4, BMD 5, BMD 6, dan BMD 7). Hasil isolasi *Bacillus* sp. dari rhizosfer *Delonix regia* mendapatkan 7 isolat (isolat BCP 1, BCP 2, BCP 3, BCP 4, BCP 5, BCP 6, dan BCP 7). Tiga isolat *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dari rhizosfer *Crotalaria mucronata* (isolat BCM 1, BCM 2, dan BCM 3). Hasil isolasi *Bacillus* sp. dari rhizosfer *Vigna sinensi* mendapatkan 2 isolat (isolat BKP 1, BKP 2, dan BKP 3). Tujuh isolat *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dari rhizosfer *Pithecolobium saman* (isolat BPS 1, BPS 2, BPS 3, BPS 4, BPS 5, BPS 6, dan BPS 7). Hasil isolasi *Bacillus* sp. dari rhizosfer *Arachis hypogaea* mendapatkan 6 isolat (isolat BAP 1, BAP 2, BAP 3, BAP 4, BAP 5, dan BAP 6). Satu isolat *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dari *Cassia siamea* (BJH). Hasil isolasi *Bacillus* sp. dari rhizosfer *Sesbania grandiflora* mendapatkan 2 isolat (isolat BSB 1, dan BSB 2). Dua isolat *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dari *Acacia auriculiformes* (BAC 1, dan BAC 2)

Pemanasan sampel tanah rhizosfer dilakukan untuk melakukan seleksi awal *Bacillus* sp.. *Bacillus* sp. akan bertahan hidup pada sampel tanah rhizosfer karena mampu membentuk endospora sedangkan bakteri yang lain akan mati akibat pemanasan. Isolat bakteri yang diperoleh diamati karakter morfologi koloninya secara visual dan dimurnikan. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, karakter koloni isolat bakteri yang diperoleh bervariasi ada yang memiliki bentuk koloni *circular* (bulat), *irregular* (bundar tak beraturan), dan *punctiform* (bulat kecil), dan variasi elevasinya *flat*, *raised*, dan *convex* (cembung) dengan variasi margin dari *entire* (halus), *undulate* (berlekuk), dan *lobate* (berombak). Koloni isolat bakteri yang didapat bervariasi, ada yang berwarna putih, krem, dan kuning (Tabel 1 dan Gambar 1).

Hasil pewarnaan Gram pada isolat bakteri hasil isolasi dari sampel tanah rhizosfer menunjukkan keseluruhan isolat merupakan Gram positif, memiliki bentuk batang dengan berbagai ukuran dan



Gambar 1. Isolat BMD 6 dan isolat BAP 3

Tabel 1. Karakterisasi Morfologi Koloni Isolat *Bacillus* sp.

Sampel Rhizosfer	Kode Isolat	Bentuk	Elevasi	Margin	Warna
<i>Mimosa diplotricha</i>	BMD 1	Circular	Raised	Entire	Krem
	BMD 2	Circular	Raised	Entire	Putih
	BMD 3	Irregular	Raised	Undulate	Putih
	BMD 4	Circular	Raised	Lobate	Putih
	BMD 5	Circular	Flat	Entire	Putih
	BMD 6	Irregular	Raised	Lobate	Putih
	BMD 7	Circular	Flat	Undulate	Putih
<i>Delonix regia</i>	BCP 1	Circular	Raised	Entire	Krem
	BCP 2	Circular	Raised	Undulate	Putih
	BCP 3	Irregular	Raised	Undulate	Putih
	BCP 4	Punctiform	Raised	Entire	Putih
	BCP 5	Punctiform	Flat	Undulate	Krem
	BCP 6	Circular	Flat	Entire	Putih
	BCP 7	Circular	Convex	Undulate	Putih
<i>Crotalaria mucronata</i>	BCM 1	Punctiform	Flat	Entire	Putih
	BCM 2	Punctiform	Flat	Entire	Putih
	BCM 3	Punctiform	Raised	Entire	Putih
<i>Vigna sinensi</i>	BKP 1	Circular	Raised	Undulate	Putih
	BKP 2	Circular	Raised	Entire	Putih
<i>Pithecolobium saman</i>	BPS 1	Circular	Raised	Entire	Krem
	BPS 2	Circular	Flat	Undulate	Putih
	BPS 3	Circular	Raised	Undulate	Putih
	BPS 4	Irregular	Raised	Entire	Putih
	BPS 5	Irregular	Flat	Undulate	Putih
	BPS 6	Punctiform	Flat	Entire	Krem
	BPS 7	Circular	Convex	Entire	Putih
<i>Arachis hypogaea</i>	BAP 1	Punctiform	Flat	Entire	Putih
	BAP 2	Circular	Convex	Entire	Krem
	BAP 3	Circular	Flat	Undulate	Krem
	BAP 4	Punctiform	Raised	Entire	Putih
	BAP 5	Irregular	Raised	Lobate	Putih
<i>Cassia siamea</i>	BJH	Irregular	Raised	Undulate	Putih
<i>Sesbania grandiflora</i>	BSB 1	Circular	Raised	Undulate	Kuning
	BSB 2	Irregular	Flat	Undulate	Putih
<i>Acacia auriculiformes</i>	BAC 1	Circular	Flat	Undulate	Putih
	BAC 2	Circular	Raised	Entire	Putih

rangkaian sel yang berbeda-beda, serta membentuk endospora (Tabel 2). Berdasarkan hasil uji katalase memperlihatkan hasil positif kecuali pada isolat BAP 2 dan BAP 5.

Sebanyak 5 isolat bakteri dari 36 isolat yang diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat dengan menggunakan media Pikovskaya menunjukkan kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Kelima isolat bakteri tersebut adalah BCP2, BCP4, BAC2, BCM3, dan BAP1. Kemampuan dalam melarutkan fosfat ditandai

dengan terbentuknya *holozone* (zona bening) disekitar koloni bakteri. Pada hari ke-4 zona bening sudah dapat diamati dan semakin lama waktu inkubasi zona bening terlihat semakin jelas.

Bacillus sp. merupakan bakteri tanah yang seringkali dijumpai di daerah rhizosfer tanaman. *Bacillus* sp. merupakan bakteri Gram positif yang memiliki sel berbentuk batang dan toleran terhadap kondisi ekologi yang dengan cekaman (Astuti, 2008). Beberapa jenisnya menghasilkan enzim ekstraseluler

Tabel 2. Karakterisasi Isolat *Bacillus* sp. hasil isolasi dari rhizosfer Leguminosae

Kode Isolat	Bentuk	Gram	Katalase	Endospora
BMD 1	Batang	+	+	+
BMD 2	Batang	+	+	+
BMD 3	Batang	+	+	+
BMD 4	Batang	+	+	+
BMD 5	Batang	+	+	+
BMD 6	Batang	+	+	+
BMD 7	Batang	+	+	+
BCP 1	Batang	+	+	+
BCP 2	Batang	+	+	+
BCP 3	Batang	+	+	+
BCP 4	Batang	+	+	+
BCP 5	Batang	+	+	+
BCP 6	Batang	+	+	+
BCP 7	Batang	+	+	+
BCM 1	Batang	+	+	+
BCM 2	Batang	+	+	+
BCM 3	Batang	+	+	+
BKP 1	Batang	+	+	+
BKP 2	Batang	+	+	+
BPS 1	Batang	+	+	+
BPS 2	Batang	+	+	+
BPS 3	Batang	+	+	+
BPS 4	Batang	+	+	+
BPS 5	Batang	+	+	+
BPS 6	Batang	+	+	+
BPS 7	Batang	+	+	+
BAP 1	Batang	+	+	+
BAP 2	Batang	+	-	+
BAP 3	Batang	+	+	+
BAP 4	Batang	+	+	+
BAP 5	Batang	+	-	+
BJH 1	Batang	+	+	+
BSB 1	Batang	+	+	+
BSB 2	Batang	+	+	+
BAC 1	Batang	+	+	+
BAC 2	Batang	+	+	+

yang dapat menghidrolisis protein dan polisakarida kompleks. Menurut Pelczar dan Chan (1986), bakteri yang termasuk dalam genus *Bacillus* memiliki bentuk batang, Gram positif, mampu membentuk endospora dan katalase positif yang sel vegetatifnya mampu bertahan hidup hingga suhu 70°C, sedangkan pada suhu lebih dari 70°C akan membentuk endospora.

Genus *Bacillus* merupakan kelompok bakteri yang memiliki habitat di tanah, makanan, rizosfer dan air termasuk air laut (Hatmanti, 2000; Astuti, 2008). Mengisolasi *Bacillus* sp. dilakukan dengan cara mensuspensikan sampel pada air dan dipanaskan pada suhu 80°C selama kurang lebih 10 sampai 30 menit merupakan teknik untuk menjarang dan memisahkan *Bacillus* sp. dari bakteri lain yang tidak membentuk endospora serta mematikan sel vegetatif

yang ada (Widayanti, 2007). Endospora merupakan struktur dengan dinding yang tebal dan lapisan tambahan pada sel bakteri yang dibentuk dibagian dalam membran sel. Endospora merupakan ciri utama spesies *Bacillus* sp. sehingga dapat digunakan untuk membedakan dari kelompok bakteri lain. Endospora memiliki kemampuan resistensi terhadap bahan kimia yang terdapat di alam, tahan terhadap panas ekstrem, kondisi kurang air, dan radiasi (Astuti, 2008; Pratiwi, 2008). Adanya endospora pada *Bacillus* sp. maka kelompok bakteri ini memiliki kemampuan beradaptasi dengan lingkungan yang ekstrem.

Pada penelitian yang dilakukan telah berhasil mengisolasi 36 isolat bakteri *Bacillus* sp. dari rhizosfer tanaman leguminosae yang lima di antaranya memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat.

Bacillus sp. banyak ditemukan di rhizosfer tanaman leguminoceae, Saini & Khanna (2015) berhasil mengisolasi bakteri anggota genus *Bacillus* dari sampel rhizosfer tanaman legum yang memiliki kemampuan tinggi dalam melarutkan fosfat. Kavamura *et al.* (2013), juga telah berhasil mengisolasi 48 rhizobakteri yang sebagian besarnya adalah anggota genus *Bacillus* dari sampel rhizosfer *Cereus jamacaru*, *Pilosocereus gounellei*, *Melocactus* sp. untuk diskriminasi kemampuannya dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman jagung pada lingkungan kering. Untuk mengetahui kemampuannya dalam memengaruhi pertumbuhan tanaman jagung isolat rhizobakteri yang diperoleh diteliti kemampuannya dalam melarutkan fosfat dan menghasilkan *Indole Acetic Acid* (IAA). Enam isolat *Bacillus* sp. memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA dan melarutkan fosfat dalam tanah.

Penelitian yang dilakukan oleh Kumar *et al.* (2012), berhasil mengisolasi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dari tanah rhizosfer tanaman kacang pada beberapa lokasi yang berbeda di India. Sebanyak 30 isolat bakteri berhasil diisolasi dan diskriminasi kemampuannya dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan fosfat, memproduksi IAA, memproduksi amonia, aktivitas deaminase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), memproduksi Hidrogen sianida (HCN) dan katalase. Isolat bakteri yang diperoleh teridentifikasi sebagai *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., dan *Pseudomonas* sp. Isolat *Bacillus* sp. mampu melarutkan fosfat, menghasilkan 163.72 µg/ml IAA, mampu memproduksi amonia, HCN, dan katalase, serta menunjukkan aktivitas deaminase ACC. Bhat dan Vyas (2014), juga berhasil mengisolasi *Bacillus subtilis* yang memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat dan memproduksi IAA, amonia, HCN, katalase, amilase, selulase, dan kitinase. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* memberikan manfaat bagi tumbuhan dengan berbagai mekanisme yang berbeda, yaitu dengan memproduksi IAA, giberelin, sitokinin, dan etilen; memfiksasi nitrogen; menekan pertumbuhan mikroorganisme yang merugikan dengan memproduksi siderofor, β-1,3-glukanase, sianida, kitinase, dan antibiotik; serta dapat melarutkan fosfat (Husen, 2003).

Bacillus sp. memiliki kemampuan melarutkan fosfat yang terikat di dalam tanah (Astuti, 2008). Pada penelitian yang telah dilakukan, diperoleh 5 isolat bakteri yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat, yaitu isolat BCP 2, BCP 4, BAC 2, BCM 3, dan BAP 1. Fosfat yang tersedia dalam media Pikovskaya berikatan dengan kalsium, adanya zona bening (*holozone*) yang terbentuk disekitar koloni pada saat pengujian mengindikasikan adanya aktivitas melarutkan dan memecah ikatan fosfat

dengan unsur lain seperti kalsium (Ca) oleh bakteri. Rizobakteri *Bacillus* sp. mampu melarutkan fosfat melalui sekresi asam organik. Mekanisme yang lain dapat terjadi karena adanya aktivitas enzim fitase yang dihasilkan oleh bakteri. Menurut Astuti (2008) dan Widayanti (2007), selain asam organik, enzim fitase (fosfomonoesterase yang menghidrolisis polifosfat organik tak larut/fitat) juga berperan untuk melarutkan fosfat.

Bakteri pelarut fosfat seperti *Bacillus* sp merupakan bakteri tanah yang mempunyai kemampuan dalam melarutkan P di dalam tanah. Bakteri ini mampu memproduksi dan melepaskan asam organik yang dapat membentuk kompleks stabil dengan kation-kation pengikat P di dalam tanah sehingga mengubah fosfat menjadi bentuk yang mudah terlarut (Gheeta *et al.*, 2014). Selain dikarenakan turunnya pH, adanya kecenderungan Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , dan Al^{3+} untuk membentuk khelat (kompleks yang stabil) dengan asam-asam organik juga menyebabkan terjadinya pembebasan P sehingga menjadi larut (Raharjo *et al.*, 2007).

Asam organik menghidrolisis fosfat terikat menjadi fitat, selanjutnya enzim fitase (fosfomonoesterase) akan menghidrolisis fitat menjadi myo-inositol dan fosfat. Fitase bakteri yang ada di daerah rhizosfer berperan dalam menurunkan bentuk fitat yang terikat. Fosfat terserap oleh akar tanaman oleh kerja 3- dan 6-(4)-fitase. Berdasarkan hal tersebut maka rizobakteria pelarut fosfat memiliki berperan yang sangat penting dalam membantu tanaman menyediakan dan menyerap fosfat (Idriss *et al.*, 2002).

Isolat *Bacillus* sp. pada penelitian ini memiliki perbedaan kemampuan dalam melarutkan fosfat. Hal ini dapat dilihat dari luas dan kejernihan *holozone* yang terbentuk disekitar koloni. Semakin luas dan jernih zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menandakan bakteri tersebut memiliki kemampuan yang tinggi dalam melarutkan fosfat yang terikat dalam medium Pikovskaya. Perbedaan kemampuan ini bisa terjadi dikarenakan perbedaan asam organik yang diproduksi oleh tiap isolat *Bacillus* sp.. Setiap jenis asam organik yang diproduksi oleh *Bacillus* sp memiliki kecocokan dan efektivitas dalam melepaskan ikatan fosfat. Diduga isolat BCP 2, BCP 4, BAC 2, BCM 3, dan BAP 1 memproduksi asam organik yang efektif dalam memecah ikatan fosfat-kalsium dalam media Pikovskaya, sedangkan isolat yang tidak membentuk zona bening atau tidak mempunyai kemampuan melarutkan fosfat dikarenakan memproduksi asam organik yang berbeda yang tidak efektif untuk memecah ikatan fosfat-kalsium (Astuti, 2008).

Karakterisasi yang dilakukan terhadap 36 isolat yang diperoleh menunjukkan bahwa bentuk sel bakteri berbentuk batang, Gram positif, membentuk endospora dan katalase positif kecuali pada isolat BAP2 dan BAP5. Hal ini menunjukkan bahwa isolat

yang didapat memiliki karakter yang dimiliki oleh genus *Bacillus*. Keragaman *Bacillus* dapat dibedakan berdasarkan karakteristik morfologi koloni yang berbeda pada media *Nutrient Agar*. Warna koloni pada umumnya putih sampai kekuningan, tepi koloni bermacam-macam tapi pada umumnya tidak rata, permukaannya kasar, dan tidak berlendir, bahkan ada cenderung kering bubuk, koloni besar dan tidak mengkilat. Bentuk koloni dan ukurannya sangat bervariasi bergantung dari jenisnya (Hatmanti, 2000). Keragaman *Bacillus* sp. juga dapat dibedakan berdasarkan karakteristik morfologi sel baik ukuran, bentuk, dan letak dari endospora; karakter pertumbuhan pada berbagai sumber karbon; kemampuan menghasilkan IAA, kitinase, selulase, siderofor, dan antibiotik (Ali *et al.*, 2014). Keberadaan endospora pada sel *Bacillus* sp. dapat terlihat karena akan terwarnai hijau oleh malakit hijau sedangkan sel bakteri berwarna merah karena pewarna safranin pada saat pewarnaan endospora.

Kemampuan dalam menggunakan oksigen bebas untuk respirasi sel juga dapat menunjukkan keragaman mikroorganismenya. *Bacillus* sp. memiliki karakter sebagai bakteri aerobik. Pada organisme aerobik adanya oksigen akan menghasilkan produk akhir metabolisme yakni produk yang bersifat toksik seperti superoksida O_2 suatu radikal oksigen bebas. Enzim katalase yang diproduksi oleh isolat *Bacillus* sp. berperan dalam mendegradasi superoksida menjadi air dan oksigen (Astuti, 2008).

SIMPULAN

Sebanyak 36 jenis isolat yang diperoleh dari isolasi sampel tanah rizosfer tanaman *Leguminosae* di sekitar Universitas Negeri Surabaya Kampus Ketintang Surabaya merupakan kelompok *Bacillus* yang lima di antaranya memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat. Isolat tersebut adalah BCP 2, BCP 4, BAC 2, BCM 3, dan BAP 1.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali S, Hameed S, Imran A, Iqbal M & Lazarovits G, 2014. Genetic, physiological and biochemical characterization of *Bacillus* sp. Strain RMB7 exhibiting plant growth promoting and broad spectrum antifungal activities. *Microbial Cell Factories* (13): 144. <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/144>.
- Astuti RP, 2008. Rhizobakteria *Bacillus* sp. asal tanah rizosfer kedelai yang berpotensi memicu pertumbuhan tanaman. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor. Diakses melalui <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/10708>. Pada tanggal 20 Desember 2012.
- Bennet, B.C. . *Twenty-Five Economically Important Plant Families*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). <http://www.eolss.net/Eolss-sampleAllChapter.aspx>.
- Bhatt PV & Vyas BRM, 2014. Screening and characterization of plant growth and health promoting Rhizobacteria. *Int.J.Curr. Microbiol.App.Sci* 3(6): 139-155. ISSN: 2319-7706. <http://www.ijcmas.com>.
- Ferfinia A, 2010. Eksplorasi bakteri dan cendawan rizofer yang berasosiasi dengan penyakit busuk basah pada batang pepaya (*Carica papaya*) di Pasir Kuda, Desa Ciomas, Bogor. *Skripsi*. Departemen Pertanian Fakultas Pertanian IPB. Bogor. Diakses melalui <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/26878>. Pada tanggal 20 Desember 2012.
- Gheeta K, Venkatesham E, Hindumathi A & Bhadrachari B, 2014. Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna radita* (L.) R.Wilczek. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3(6): 799-809. ISSN: 2319-7706. <http://www.ijcmas.com>.
- Hatmanti A, 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana Volume XXV*(1): 31-41. ISSN 0216-1877. www.oseanografi.lipi.go.id.
- Heyne K, 1988. Tumbuhan Berguna Indonesia Volume 4. Yayasan Sarana Wana Jaya. Departemen Kehutanan.
- Husen E, 2003. Screening of Soil Bacteria for Plant Growth Promotion Activities In Vitro. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 4(1): 27-31.
- Idriss EE, Makarewicz O, A. Farouk, K. Rosner, R. Grenier, H. Bochow, T. Richter, R. Borris. 2002. Extracellular Phytase Activity of *Bacillus Amyloliquefaciens* FZB45 Contributes to Its Plant-Growth-Promoting Effect. *Microbiology* 148: 2097-2109.
- Kavamura VN, Santos SN, da Silva JL, Parma MM, Ávila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD, de Melo IS, 2013. Screening of Brazilian Cacti Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Under. *Microbiological Research* 168: 183-191. www.elsevier.com/locate/micres.
- Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal & Negi S, 2012. Isolation, Screening and Characterization of Bacteria from Rhizospheric Soils for Different Plant Growth Promotion (PGP) Activities: An In Vitro Study. *Recent Research in Science and Technology* 4(1): 01-05. ISSN: 2076-5061. <http://recent-science.com/>.
- Pelczar MJ & Chan ECS, 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* 1. (Penerjemah: Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarni Tjitrosomo, Sri Lestari Angka). UI Press. Jakarta.
- Pratiwi ST, 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Airlangga: Jakarta.
- Raharjo B, Supriyadi A & Agustini DK, 2007. Pelarut Fosfat Anorganik Oleh Kultur Campuran Jamur Pelarut Fosfat Secara In vitro. *Jurnal Sains & Matematika (JSM)* 15 (2): 45-54. ISSN 0854-0675.
- Saini P & Khanna V, 2015. Isolation and screening of lentil rhizobacterial *Bacillus* sp. for Direct Plant Growth. *Journal of Biological and Chemical Sciences* (JBACS). ISSN 2394-9139 (P), 2394-9147 (O). Scienceindoors.
- Silitonga DM, Priyani N & Nurwahyuni I, 2011. Isolasi dan Uji Isolat Bakteri Pelarut Fosfat dan Bakteri Penghasil Hormon IAA (*Indole Acetic Acid*) Terhadap Pertumbuhan Kedelai (*Glycine max* L.) pada Tanah Kuning. Universitas Sumatera Utara. Medan. Diakses melalui <http://jurnal.usu.ac.id/index.php/sbiologi/article/view/1280/667>. Pada tanggal 20 Desember 2012.
- Subandi, 2010. *Mikrobiologi Perkembangan, Kajian dan Pengamatan dalam Perspektif Islam*. Bandung: Remaja Rosdakarya.
- Widayanti T, 2007. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus* sp. Indigenous Penghasil Asam Indol Asetat Asal Tanah Rizosfer. *Skripsi*. Departemen Biologi FMIPA IPB. Bogor. Diakses melalui <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/14624/G07twi.pdf;jsessionid=DF4817146B8735C9FBD821DFE154E02E?sequence=3>. Pada tanggal 20 Desember 2012.