

Aktivitas Fosfatase dan Pelarutan Kalsium Fosfat oleh beberapa Bakteri Pelarut Fosfat

Phosphatase Activity and Solubilization of Calcium phosphate by Phosphate Solubilizing Bacteria

SULIASIH*, RAHMAT

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002

Diterima: 14 September 2006. Disetujui: 29 Desember 2006.

ABSTRACT

A study was undertaken to investigate the ability of phosphate solubilizing bacteria to solubilize insoluble phosphate. Seventeenth phosphate solubilizing bacteria were isolated from soil in Wamena, Papua. These organism was identified as *Bacillus* sp, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus megaterium*, *flavobacterium* sp, *Flavobacterium breve*, *Klebsiella aerogenes*, *Chromobacterium lividum* and *Pseudomonas* sp. Four isolates (*B. pantothenicus*, *K. Aerogenes*, *B megaterium* and *C. lividum*) are chosen for further study. *B pantothenicus* Solubilizer greatest amount of tricalcium phosphate indicated by increasing of orthophosphate about 12.39 mg/l in liquid medium. Four isolates also produces phosphatase and the highest phosphatase activity is from *B. pantothenicus* about 1.947 ug p-nitrophenol/g/h.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words : phosphate solubilizing bacteria

PENDAHULUAN

Fosfor (P) merupakan salah satu unsur utama yang diperlukan tanaman dan memegang peranan penting dalam proses metabolisme. Dalam tanah dijumpai fosfor organik dan anorganik, keduanya merupakan sumber penting bagi tanaman. Tanaman menyerap fosfor dalam bentuk $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} dan PO_4^{3-} . Pada umumnya bentuk $H_2PO_4^-$ lebih tersedia bagi tanaman daripada HPO_4^{2-} dan PO_4^{3-} . Ketersediaan fosfor anorganik sangat ditentukan oleh pH tanah, jumlah dan tingkat dekomposisi bahan organik serta kegiatan jasad mikro dalam tanah (Lal, 2002).

Ketersediaan P dalam tanah pada umumnya rendah. Hal ini disebabkan P terikat menjadi Fe-fosfat dan Al-fosfat pada tanah masam atau $Ca_3(PO_4)_2$ pada tanah basa. Tanaman tidak dapat menyerap P dalam bentuk terikat dan harus diubah menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman. Mikroba tanah berperan dalam beberapa aktivitas dalam tanah seperti pelarutan P terikat oleh sekresi asam, dan mineralisasi komponen fosfat organik dengan mengubahnya menjadi bentuk anorganik (Cunningham and Kuyack, 1992).

Beberapa bakteri tanah seperti bakteri pelarut fosfat mempunyai kemampuan untuk melarutkan P organik menjadi bentuk fosfat terlarut yang tersedia bagi tanaman. Efek pelarutan umumnya disebabkan oleh adanya produksi asam organik seperti asam asetat, asam format, asam laktat, asam oksalat, asam malat dan asam sitrat yang

dihasilkan oleh mikroba tersebut. Mikroba tersebut juga memproduksi asam amino, vitamin dan growth promoting substance seperti IAA dan asam giberelin yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman (Richardson, 2001; Gyaneshwar, *et al.*, 2002; Ponmugaran, 2006).

Mineralisasi fosfat organik juga melibatkan peran mikroba tanah melalui produksi enzim fosfatase seperti fosfatase asam dan basa. Beberapa enzim fosfatase seperti fosfomonoesterase, fosfodiesterase, trifosfomonoesterase dan fosfoamidase pada umumnya terdapat didalam tanah. Enzim-enzim tersebut bertanggung jawab pada proses hidrolisis P organik menjadi fosfat anorganik ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) yang tersedia bagi tanaman. (Pang, 1986; Mearyard, 1999; Lal, 2002).

Untuk menentukan aktivitas enzim fosfomonoesterase (PME), dapat digunakan berbagai fosfat yang dihasilkan dari mineralisasi esterfosfat organik alami atau komponen organik buatan seperti fenilfosfat dan p-nitrofenilfosfat (p-NPP) sebagai substrat. Penggunaan fenil fosfat dan p-nitrofenil fosfat (p-NPP) sebagai substrat secara potensial akan menginduksi produksi enzim fosfomonoesterase serta mengindikasikan kemampuan hidrolisis bentuk P organik oleh enzim fosfomonoesterase (Tabatabai and Premner, 1965).

Pengukuran aktivitas PME dapat dilakukan dari tanah dan kultur murni. Dalam percobaan ini akan dilakukan pengukuran PME dari kultur murni yang bertujuan untuk memilih biak dengan PME yang tinggi dan dapat dipilih sebagai biak yang potensial yang dapat digunakan sebagai pupuk hayati.

▼ Alamat Korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18 Bogor 16002

Telp.: +62-251-324006, Fax. +62-251-325854

Email : widadomon@yahoo.com

BAHAN DAN METODE

Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari tanah Wamena, Papua.

Tanah diambil secara acak dari kedalaman 0 – 15cm dari beberapa tempat di kawasan Wamena, Papua kemudian dicampur. Campuran tanah dikeringanginkan dan digerus kemudian diayak dengan ayakan berdiameter 2mm. Sepuluh gram tanah yang telah dikeringanginkan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml berisi 90 ml aquades steril, kemudian di gojok selama 1 jam pada shaker dengan kecepatan 120 rpm (sampai homogen). Dibuat satu seri pengenceran 10^{-1} – 10^{-7} dari ekstrak tanah dan masing-masing pengenceran diambil 0,2 ml dengan pipet steril dan dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dituangkan media agar pikovskaya yang terdiri dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 gr, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 gr; NaCl 0,2 gr; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gr; KCl 0,2 gr; Glukosa 10 gr; ekstrak ragi 0,5 gr; agar 20 gr; MnSO_4 dan FeSO_4 sedikit, akuades 1000 ml (SubbaRao, 1982; Gaur 1981). Biakan yang ditanam pada cawan petri yang telah yang telah memadat disimpan secara terbalik dalam inkubator dengan suhu sekitar 30°C . Setelah tiga sampai tujuh hari inkubasi koloni diamati setiap hari. Keberadaan bakteri pelarut fosfat akan ditunjukkan dengan terbentuknya koloni yang dikelilingi daerah bening (holozone). Koloni tersebut dimurnikan dan dipindahkan ke tabung reaksi agar miring berisi media pikovskaya, selanjutnya diidentifikasi. Jenis BPF yang didapatkan disimpan untuk penelitian selanjutnya.

Uji Kemampuan BPF Melarutkan P dalam Media Pikovskaya Padat.

Bakteri pelarut fosfat yang telah diidentifikasi dari percobaan pertama, lalu diuji pada cawan petri yang berisi media pikovskaya padat steril. Sebagai sumber fosfat digunakan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Bakteri pelarut fosfat yang membentuk daerah bening paling cepat dengan diameter paling besar akan digunakan sebagai inokulum pada percobaan selanjutnya.

Uji Kemampuan BPF Melarutkan Tricalcium fosfat dalam Media Pikovskaya Cair.

Pengujian dilakukan menurut metoda Gaur (1981). Pada erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 ml media pikovskaya cair yang berisi $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ diberi BPF. Sumber P yang digunakan dalam media tersebut adalah $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dengan dosis 5 g/l. Masing-masing erlenmeyer diberi ekstrak BPF dengan spesies yang berbeda (A= *B. Pantothenicus* B= *Klebsiella aerogenis*, C=*Bacillus megaterium*, D= *Chromobacterium lividum*).

Erlenmeyer yang masing-masing berisi biakan tersebut digojok dalam shaker dengan kecepatan putar 120 rpm selama 1 minggu. Setiap hari diamati P yang dapat larut yang dicirikan dengan adanya ortofosfat pada media cair.

Pengukuran pH dan Rapat Optis (OD)

Sebanyak 20 ml sampel diukur pH-nya. Sebanyak 0,5 ml sampel diencerkan dengan 7 ml air destilasi, digunakan untuk pengukuran OD dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm dan sisanya disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang dihasilkan digunakan untuk pengukuran lebih lanjut.

Pengukuran aktivitas enzim fosfomonoesterase (PME-ase)

Sebanyak 1 ml supernatan sampel ditambahkan dengan 1 ml substrat p-NPP fosfat 115 Mn dan 4 ml buffer

asetat pH 6,5 dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 38°C . Pada hasil inkubasi ditambahkan 1 ml CaCl_2 0,5M lalu dikocok. Kontrol dibuat dengan prosedur yang sama pada sampel, tetapi penambahan 1 ml larutan substrat dilakukan setelah penambahan 1 ml CaCl_2 0,5M. Sampel dan kontrol diukur absorbannya pada panjang gelombang 400 nm. Standar dan blanko mendapat perlakuan yang sama seperti sampel. Standar menggunakan larutan p-nitrofenol dengan konsentrasi 1-6 ppm, sedangkan untuk blanko menggunakan air destilasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi

Hasil isolasi dan identifikasi dari contoh tanah dapat dikoleksi 17 isolat BPF dan didominasi oleh genus *Bacillus* yaitu 4 (empat) isolat *Bacillus* sp., 4 (empat) isolat *B. pantothenicus* dan 1 (satu) isolat *B. megaterium*. Diikuti oleh *Flavobacterium* sp., (3 isolat) dan *F. Breve* (1 isolat), jenis lainnya *Klebsiella aerogenes* (2 isolat). *Pseudomonas* sp dan *Chromobacterium lividum* masing-masing 1 isolat (Tabel 1). Keberadaan mikroba dalam tanah tergantung dari faktor kimia tanah, fisik tanah, vegetasi, rotasi tanaman dan kondisi lingkungan (Taha, et al., 1969). Swaby dan Sperber serta Monkina dalam Taha, et al., (1969) mendapatkan bahwa genus BPF yang umum ditemukan dalam tanah adalah *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acrobacter* dan *Flavobacterium*. *Bacillus megaterium* diketahui juga aktif dalam melarutkan P. Rodriguez and Fraga (1999) melaporkan bahwa strain dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Rhizobium* mempunyai kemampuan dalam melarutkan fosfat.

Kemampuan BPF melarutkan P dalam media Pikovskaya padat.

BPF yang telah teridentifikasi tersebut kemudian diukur kemampuannya dalam melarutkan P pada media Pikovskaya padat. Bakteri yang tumbuh pada media akan melarutkan P yang ditandai oleh daerah bening (holozone) yang mengelilingi koloni bakteri tersebut. Hal ini disebabkan adanya pelarutan partikel halus dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Isolat yang menunjukkan daerah bening tersebut selama pengamatan 1 minggu yaitu *Bacillus pantothenicus* dengan diameter 1,35 cm dan yang terkecil adalah *Flavobacterium* sp. (0,45

Tabel 1. Kemampuan BPF melarutkan P dalam media Pikovskaya

No. Isolat	Jenis BPF	Diameter Halozone*
1	<i>Bacillus pantothenicus</i>	0,95
2	<i>Bacillus pantothenicus</i>	1,10
3	<i>Bacillus pantothenicus</i>	1,35
4	<i>Flavobacterium</i> sp	0,45
5	<i>Klebsiella aerogenes</i>	0,90
6	<i>Bacillus</i> sp	1,15
7	<i>Pseudomonas</i> sp	0,85
8	<i>Flavobacterium breve</i>	0,65
9	<i>Bacillus</i> sp	0,90
10	<i>Bacillus pantothenicus</i>	1,00
11	<i>Chromobacterium lividum</i>	1,15
12	<i>Klebsiella aerogenes</i>	0,85
13	<i>Bacillus</i> sp	1,20
14	<i>Bacillus</i> sp	0,95
15	<i>Flavobacterium</i> sp	0,90
16	<i>Bacillus megaterium</i>	1,30
17	<i>Flavobacterium</i> sp	0,95

*rata-rata dari 1 minggu pengamatan/cm

cm) (Tabel 1). Dilihat dari luas daerah bening yang dihasilkan dapat diketahui bahwa kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat bervariasi. Luas daerah bening secara kualitatif menunjukkan besar kecilnya kemampuan bakteri melarutkan P dari fosfat tak larut (Rachmiati, 1995). Tatiek (1991) juga mengemukakan bahwa daerah bening pada media padat tidak dapat menunjukkan banyak sedikitnya jumlah P terlarut yang dapat disumbangkan oleh setiap bakteri, meskipun luas sempitnya daerah bening dapat menunjukkan besar kecilnya bakteri melarutkan P sukar larut.

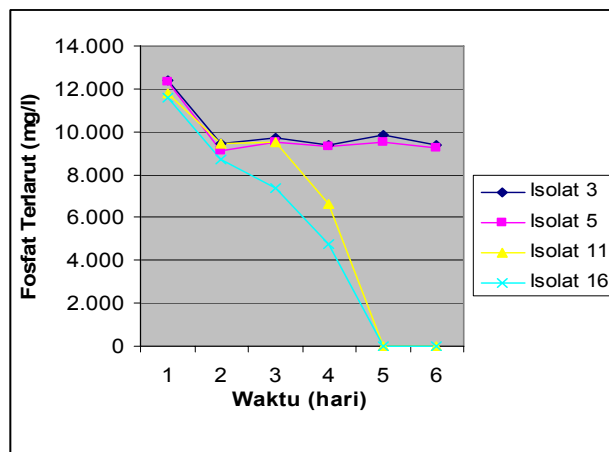
Kemampuan BPF melarutkan P dalam media Pikovskaya cair.

Dari 17 isolat yang didapat kemudian diambil 4 isolat untuk diuji kemampuannya dalam melarutkan P yaitu isolat 3 (*B. pantothenicus*), isolat 5 (*Klebsiella aerogenes*), isolat 11 (*Chromobacterium lividum*) dan isolat 16 (*B. megaterium*). Gambar 1 menunjukkan kemampuan BPF dalam melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dalam media pikovskaya cair. Setiap spesies bakteri mempunyai kemampuan secara genetik yang berbeda dalam menghasilkan asam-asam organik baik dalam jumlah maupun jenisnya selama pertumbuhan. Jumlah dan jenis asam-asam organik inilah yang berperan dalam menentukan tingginya pelarutan P (Tatiek, 1991). Konsentrasi fosfat terlarut pada media cair berfluktuasi dan yang tertinggi didapat pada pengamatan hari ke pertama (setelah 2 hari inkubasi) untuk semua isolat yang diamati. Konsentrasi fosfat tertinggi untuk isolat 3 yaitu sebesar 12,387 mg/l, terjadi penurunan pada hari ke-2 dan ke-4 dan kenaikan pada hari ke-3 dan ke-5. Konsentrasi tertinggi untuk isolat 5 yaitu 12,305 mg/l dan pola pelarutannya hampir sama dengan isolat 3. Konsentrasi fosfat tertinggi untuk isolat 11 dan 16 masing-masing sebesar 11,766 mg/l dan 11,570 mg/l, kemudian terjadi penurunan sampai tidak terjadi aktivitas pelarutan P pada hari ke-6.

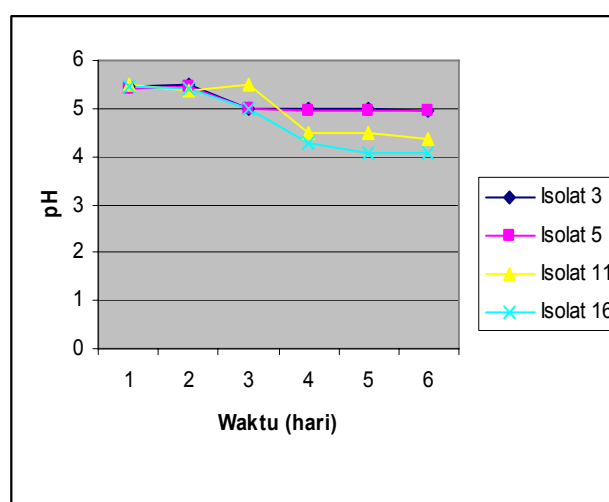
Perubahan nilai pH pada media cenderung menurun untuk semua isolat yang diamati. (gambar 2). Nilai pH pada isolat 3 dan 5 masih terjadi kenaikan kemudian cenderung menurun sampai hari ke-6. Nilai pH tertinggi untuk isolat 11 dan 16 terjadi pada hari ke-1 kemudian menurun sampai hari ke-6. Penurunan pH pada media disebabkan oleh asam-asam organik yang dibebaskan oleh BPF dalam aktivitasnya, BPF akan membebaskan sejumlah asam-asam organik antara lain asam sitrat, glutamat, suksinat, laktat, oksalat, glikooksalat, malat, fumarat, tartarat dan asam alpha ketobutirat. Meningkatnya asam-asam organik tersebut biasanya diikuti dengan penurunan pH yang tajam, sehingga berakibat terjadinya pelarutan Ca-fosfat. Asam-asam organik ini akan membentuk "khelat" (kompleks stabil) dengan kation Al, Fe dan Ca yang mengikat P, sehingga ion H_2PO_4^- (Taha, 1969; Kucey, 1983 dan Subba Rao, 1982).

Pertumbuhan Populasi

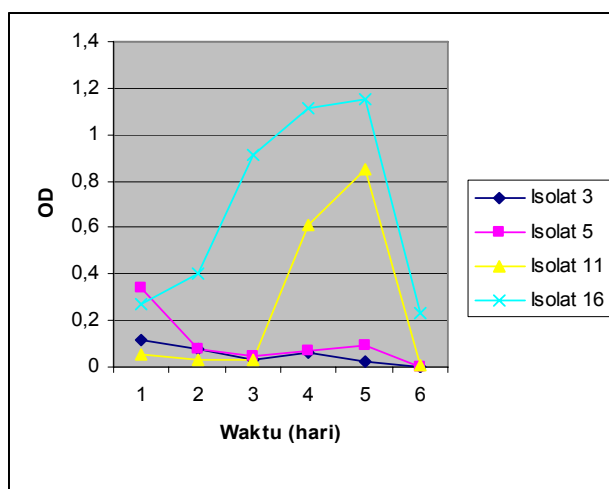
Pertumbuhan populasi pada media cair dapat dilihat dengan menggunakan metoda 'optical density (OD)/ Rapat Optis. Rapat Optis dari suspensi bakteri pada umumnya berkorelasi dengan jumlah sel yang terdapat pada media. Pertumbuhan populasi BPF pada media pikovskaya cair dapat dilihat pada gambar 3. Pertumbuhan populasi tertinggi terjadi pada hari ke-1 untuk isolat 3, 5 dan 11, kemudian menurun sampai hari ke-3 dan terjadi lagi peningkatan populasi/ kekeruhan sampai hari ke-5. Peningkatan rapat optis pada hari ke-5 kemungkinan bukan disebabkan adanya populasi BPF yang tumbuh, tetapi



Gambar 1 . Konsentrasi fosfat terlarut



Gambar 2 . Perubahan nilai pH



Gambar 3 . Pertumbuhan populasi

adanya jumlah sel yang mati menjadikan media lebih keruh. Pertumbuhan isolat 16 masih berlangsung sampai hari ke-5 dan pada hari ke-6 terjadi penurunan populasi yang tajam.

Aktivitas enzim PME-ase

Aktivitas enzim PME-ase dapat dilihat pada gambar 4. Aktivitas enzim tertinggi terjadi pada hari ke-3 untuk semua

isolat yang diamati. Aktivitas enzim tertinggi didapat oleh isolat-3 yaitu sebesar 1,947 ug p-nitrophenol/g/ jam. Diikuti oleh isolat-5, isolat-11 dan isolat-16 masing-masing sebesar 1,934 ug p-nitrophenol/g/ jam; 1,849 ug p-nitrophenol/g/ jam dan 1,818 ug p-nitrophenol/g/ jam.

KESIMPULAN

Hasil isolasi dari tanah Wamena dapat dikoleksi 17 jenis BPF dan didominasi oleh genus *Bacillus*. Dari 4 isolat yang diuji semuanya dapat melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pada media cair dan mempunyai kemampuan untuk memproduksi enzim fosfatase. Isolat yang menghasilkan zona bening dengan diameter terbesar pada media padat dan melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tertinggi pada media cair juga aktivitas fosfatase yang tinggi didapat oleh *B. pantothenicus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Cunningham, J.E., and C. Kuyack. 1992. Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Appl. Environ. Microbiol. 58:1451-1458
- Gaur, A.C. 1981. Phospho-microorganism and varians transformation In Compost Technology, Project Field Document No. 13 FAO. P.106-111
- Gyaneshwar.P., G.N.Kumar , L.J. Parekh and P.S. Poole. 2002. Role of soil microorganism in improving P nutrition of Plants. Plant soil 245: 83-93.
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing Bacteria and Fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Can. J. Soil Sci. 63:671-678
- Lal.L. 2002. Phosphate biofertilizers. Agrotech. Publ. Academy, Udaipur. India. 224p.
- Mearyard.B. 1999. Phosphate enzymes from plants. Journal of Biological Education, 33(2): 109-112.
- Pang.P.C.K. and H.Kolenk. 1986. Phosphomonoesterase activity in forest soils. Soil Biol. Biochem. 18 (1): 35-40.
- Ponmurugan.P., and C. Gopi. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. African Journal of Biotechnology 5(4):348-350.
- Rachmiati, Y. 1995. Bakteri pelarut fosfat dari rizozfer tanaman dan kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Proseding Kongres Nasional VI HITI, Jakarta, 12-15 Desember 1995.
- Richardson.A.E. 2001. Prospect for using soil microorganisms to improve the aquisition of phosphorus by plants. Aust. J. Plant Physiol. 58: 797-906.
- Rodriguez.H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv. 17:319-339.
- Subba Rao, N.S. 1982a. Biofertilizer in Agricultural. Oxford and IBH Publishing Co.
- Subba Rao, N.S. 1982b. Mikroorganisma tanah dan pertumbuhan tanaman. Edisi ke-2 Penerbit UI.
- Tabatabai.M.A. and J.M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate assay of soil phosphatase activity. Soil. Biol. Biochem. 1: 301-307.
- Taha, S.M., S.A.Z. Mahmoud, A. Halim El Damaty and A.M. Abd. El. Hafez. 1969. Activity of phosphate dissolving bacteria in egyptian soils. Plant and Soil XXXI, No.1.
- Tatiek, H. 1991. Bakteri pelarut fosfat asal beberapa jenis tanah dan efeknya terhadap pertumbuhan dan hasil jagung (*Zea mays* L.) . Disertasi Universitas Padjadjaran, Bandung.