

# Uji Laboratorium *Azospirillum* sp. yang Diisolasi dari Beberapa Ekosistem

Widawati, S<sup>1)</sup> dan Muharam, A<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Jl. Raya Jakarta, Km 46, Bogor

<sup>2)</sup>Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 10, Bogor, Jawa Barat 16114  
Naskah diterima tanggal 25 Juni 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 13 Agustus 2012

**ABSTRAK.** Beberapa mikroba yang bersifat nonpatogenik dan nonsimbiotik yang efektif menambat nitrogen dari udara serta mampu melarutkan P terikat pada Ca, Al, dan Fe dalam tanah, dapat hidup dalam berbagai ekosistem di alam. Sebagian bakteri tersebut dapat diisolasi dari daerah perakaran tanaman hortikultura. Penelitian bertujuan mengetahui peran *Azospirillum* sp. yang potensial sebagai pendorong pertumbuhan tanaman pada ekosistem pantai dan kondisi lingkungan yang ekstrim. Pengujian terhadap isolat bakteri yang dikumpulkan dari berbagai kondisi ekosistem dilaksanakan di Laboratorium Ekofisiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Bogor dari Bulan Januari sampai dengan Desember 2011. Sebanyak 34 isolat *Azospirillum* sp. diuji dengan berbagai metode, yaitu (1) uji kualitatif kemampuan isolat *Azospirillum* sp. dalam menambat (fiksasi) nitrogen dan kemampuan hidup pada media Okon padat yang mengandung NaCl, (2) uji kualitatif kemampuan isolat *Azospirillum* sp. dalam melarutkan P terikat pada  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dalam media Pikovskaya padat dan indeks efisiensi pelarutan fosfat, (3) uji kualitatif kemampuan isolat *Azospirillum* sp. dalam melarutkan P terikat pada media Pikovskaya cair dan aktivitas enzim PME-ase asam dan basa, serta kondisi pH selama inkubasi 7 hari pada kultur murni (pH asal = 7), dan (4) analisis kemampuan *Azospirillum* sp. dalam memproduksi indole acetic acid (IAA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa: (1) semua isolat bakteri yang diuji mampu menambat nitrogen dalam media Okon padat, (2) isolat B2, B4, B6, B12, B14, PS2, dan FR13 mampu melarutkan P dari  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dalam medium Pikovskaya padat dengan masing-masing indeks efisiensi pelarutan sebesar 120, 160, 140, 100, 110, 120, dan 100, (3) isolat B1, B2, B3, B4, B6, B14, B17, PS1, PS2, PS3, FR1, FR5, FR7, FR8, FR10, FR12, dan FR13 mampu tumbuh dalam medium Okon dengan kandungan NaCl sebesar 0, 2, 4, atau 6%, (4) konsentrasi tertinggi P terlarut dihasilkan oleh isolat B4 (5,80 mg/l), B6 (5,84 mg/l), dan PS2 (5,45 mg/l) dengan PME-ase sebesar 0,58 u/ml, 0,58 u/ml, 0,57 u/ml (asam), 0,52 mg/l, 0,50 mg/l, 0,48 mg/l (basa), dan dengan pH : 4,20, 4,30, dan 4,22, dan (5) isolat B4 dan B6 yang diisolasi dari pertanaman padi di pantai Rambut Siwi, Bali, mampu memproduksi IAA tertinggi, yaitu masing-masing sebesar 0,6749 dan 0,4694 ppm pada hari pertama setelah perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian ini terbukti bahwa isolat *Azospirillum* sp. berpotensi sebagai *plant growth promoter* untuk ekosistem di daerah pesisir atau pantai. Bakteri tersebut sangat penting untuk pengkayaan nutrisi pada lahan di daerah dataran rendah atau pantai dalam rangka pengembangan tanaman termasuk komoditas hortikultura.

Katakunci: *Azospirillum*; IAA; Bakteri pelarut fosfat; Bakteri penambat nitrogen; Rizobakteria pendorong pertumbuhan tanaman

**ABSTRACT.** Widawati, S and Muharam, A 2012. The Laboratory Test of *Azospirillum* sp. Isolated from Several Ecosystems. Microbes that are nonpathogenic and nonsymbiotic bacteria which are effectively fixed up nitrogen from air, and are able to dissolve phosphated bounded on Ca, Al, and Fe in soil, are able to growth in different ecosystems in nature. Some of the bacterial species can be isolated from rizosphere of horticultural crops. The research was aimed to determine the potential role of *Azospirillum* sp. as a plant growth promoter in coastal ecosystem and extremely environmental conditions. The laboratory test of *Azospirillum* sp. isolated from several ecosystems was carried out in the Ecophysiology Laboratory, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Bogor from January until December 2011. Thirty-four isolates of *Azospirillum* sp. (B1 to B17; PS1 to PS3; FR1 to FR 14) were investigated with some methods i.e. (1) the qualitative test of the capability of *Azospirillum* sp. to fix up nitrogen in solid Okon medium containing NaCl, (2) the qualitative test of the capability of *Azospirillum* sp. in dissolving bounded P in solid Pikovskaya medium and phosphate dissolution efficiency index, (3) the qualitative test of the capability of *Azospirillum* sp. in dissolving bounded P in liquid Pikovskaya medium and the activity of acid and base PME-ase, and pH condition after 7 days incubation in pure media, and (4) analysis of the capability of *Azospirillum* sp. in producing indole acetic acid (IAA). The results pointed out that : (1) all tested isolates of *Azospirillum* sp. were capable to fix up nitrogen in solid Okon medium, (2) isolates of B2, B4, B6, B12, B14, PS2, and FR13 were capable to solubilize P on  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in solid Pikovskaya medium with its efficiency of 120, 160, 140, 100, 110, 120, and 100, respectively, (3) isolates of B1, B2, B3, B4, B6, B14, B17, PS1, PS2, PS3, FR1, FR5, FR7, FR8, FR10, FR12, and FR13 were able to grow in Okon medium with 0, 2, 4, or 6% of NaCl doses, (4) the highest concentrations of solubilized P was resulted by isolates B4 (5.80 mg/l), B6 (5.84 mg/l), and PS2 (5.45 mg/l) with PME-ase i.e. 0.58 u/ml, 0.58 u/ml, 0.57 u/ml (acid), 0.52 mg/l, 0.50 mg/l, 0.48 mg/l (base), and with pH : 4.20, 4.30, and 4.22, and (5) isolates of B4 and B6 isolated from rice field at Rambut Siwi beach, Bali, were capable to produce highest IAA hormone i.e. 0.6749 and 0.4694 ppm respectively on the first day after the treatment. Based on the result of this experiment it can be concluded that *Azospirillum* sp. is a potential plant growth promoting Rhizobacteria for coastal ecosystem. The bacterial species is very important to enrich coastal areas for crop cultivation, including horticulture.

Keywords: *Azospirillum*; IAA; Phosphate solubilizing bacteria; Nitrogen fixing bacteria, Plant growth promoting rhizobacteria

Permasalahan utama yang dihadapi dalam pengembangan pertanian pada lahan dengan salinitas tinggi di Indonesia ialah keterbatasan varietas tanaman yang adaptif terhadap kondisi tersebut dan

teknologi pembudidayaannya. Penggunaan pupuk hayati (*biofertilizer*) merupakan salah satu upaya yang potensial untuk dikembangkan pada lahan dengan salinitas tinggi. Keberadaan pupuk hayati dalam

lahan tersebut akan membantu dalam penyediaan unsur-unsur hara yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman.

Beberapa mikroba nonpatogenik dan nonsimbiotik yang juga efektif menambat nitrogen dari udara serta mampu melarutkan P terikat pada Ca, Al, dan Fe dalam tanah, dapat hidup di berbagai ekosistem di alam. Mikroba tersebut mampu bertahan hidup pada ekosistem dataran tinggi atau pegunungan, dataran rendah sampai daerah pantai, dan dapat hidup pada ekosistem yang mempunyai tingkat kemasaman tinggi dan rendah, bahkan dijumpai juga pada ekosistem yang teracuni pestisida serta pada kondisi tanah marginal. Salah satu mikroba yang dijumpai hidup pada ekosistem tersebut ialah genus *Azospirillum*. Keberlangsungan hidup bakteri tersebut dalam tanah masih bergantung pada sifat kimia dan fisik tanah, serta kondisi air, sedimen, aerasi, kesuburan, pH, dan keberadaan aneka vegetasi yang tumbuh pada ekosistem tersebut.

Bakteri *Azospirillum* sp. hidup bebas dalam tanah di sekitar akar dan permukaan akar tanaman. Bakteri tersebut mampu menyediakan unsur N dan P bagi pertumbuhan tanaman (Widawati 2011b), serta sekaligus sebagai bakteri pemantap agregat tanah (Miharja 2003). *Azospirillum* juga dapat merombak bahan organik kelompok karbohidrat, seperti selulosa dan amilosa, serta bahan organik yang mengandung sejumlah lemak dan protein di dalam tanah. Hidupnya dalam habitat rizosfer tanaman dapat berasosiasi dan berinteraksi dengan perakaran, sehingga berperan dalam mengubah morfologi akar, seperti bertambahnya jumlah akar rambut, akar semakin panjang, dan permukaan akar yang semakin luas (Okon 1985). Perubahan tersebut berdampak terhadap pertumbuhan tanaman secara keseluruhan, sehingga bakteri *Azospirillum* sp. dimasukkan ke dalam kelompok Rizobakteria (Khairul 2001).

*Azospirillum* sp. merupakan salah satu bakteri dari kelompok *Rhizobacteria*, berpotensi sebagai pupuk hayati (Widawati 2011a, Nurosid 2008) ataupun sebagai *plant growth promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Glick 1995). Bakteri tersebut mampu menambat nitrogen ( $N_2$ ) dari udara (Okon 1985) dalam kondisi mikroaerofil (Rao 1982) dan mengubahnya menjadi  $NH_3$  menggunakan enzim nitrogenase, kemudian diubah menjadi glutamin atau alanin (Waters *et al.* 1998), sehingga bisa diserap oleh tanaman dalam bentuk  $NO_3$  dan  $NH_4^+$ . Kemampuannya dalam fiksasi nitrogen sebanyak 40–80% dari total nitrogen dalam rotan, dan 30% dari total nitrogen dalam tanaman jagung (Eckert *et al.* 2001b). Bakteri tersebut juga mampu melarutkan P terikat pada Al, Ca, dan Fe dalam tanah menjadi unsur P tersedia bagi tanaman (Widawati

2011b). *Azospirillum* sp. sebagai pelarut fosfat berperan dalam mineralisasi fosfat organik melalui produksi enzim fosfatase asam dan basa, khususnya fosfomonoesterase. Enzim tersebut dapat melepaskan satu ikatan ester pada P organik melalui proses hidrolisis P organik menjadi P anorganik ( $H_2PO_4$ ) dan  $HPO_4^{2-}$ ) yang tersedia bagi tanaman (Lal 2002). Enzim tersebut banyak dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat apabila ketersediaan fosfor dalam tanah rendah. Bakteri tersebut juga mampu memproduksi *indole acetic acid* (IAA) untuk merangsang pertumbuhan tanaman (Dobereiner & Day 1976) sebesar 285,51 g/l dari total medium kultur, sehingga dapat meningkatkan efisiensi pemupukan (Akbari *et al.* 2007) dan mampu menghasilkan giberelin, auksin, serta senyawa yang menyerupai sitokinin (Rao 1982).

Penelitian ini bertujuan mengetahui kemampuan *Azospirillum* sp. untuk bertahan hidup pada ekosistem bersalinitas tinggi dan kemampuannya dalam menambat nitrogen, melarutkan P terikat, dan menghasilkan IAA. Dari sejumlah isolat *Azospirillum* sp. yang dikumpulkan dari beberapa ekosistem diharapkan ada beberapa yang potensial untuk dikembangkan sebagai pupuk hayati dan PGPR. Hasil pengujian laboratorium terhadap isolat *Azospirillum* sp. sangat bermanfaat untuk membuat inokulan *Azospirillum* yang potensial dan efektif sebagai pupuk hayati dan PGPR, khususnya untuk pengembangan pertanian pada ekosistem pesisir dan kondisi lingkungan yang ekstrim seperti lahan gambut.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ekofisiologi dan Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong, Bogor, sejak Januari sampai dengan Desember 2011. Bahan yang digunakan berupa 34 isolat bakteri *Azospirillum* sp. (B1 sampai dengan B17; PS1, PS2, dan PS3; FR1 sampai dengan FR14).

### Uji Kualitatif Kemampuan *Azospirillum* dalam Menambat Nitrogen dan Kemampuan Hidup pada Medium Okon Padat yang Mengandung NaCl

Sebanyak 34 sampel dikumpulkan dari beberapa kondisi ekosistem. Isolasi bakteri dilakukan dengan menimbang 10 g material sampel atau mengambil 10 ml air laut, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 250 ml yang berisi 90 ml akuades steril. Erlenmeyer tersebut digoyang dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 60 menit atau sampai larutan tersebut homogen. Selanjutnya sampel tersebut dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-7}$ . Sebanyak 0,2 ml ekstrak sampel dari

masing-masing pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ , dan  $10^{-7}$  diambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Komposisi media Okon yang digunakan sebagai berikut : 6,0 g  $K_2HPO_4$ ; 4,0 g  $KH_2PO_4$ ; 0,02 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g NaCl; 0,02 g  $CaCl_2$ ; 1,0 g  $NH_4Cl$ ; 5,0 g DL asam malat; 3,0 g NaOH; 0,1 g ekstrak khamir (Difco); 10,0 mg  $FeCl_3$ ; 2,0 mg  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 2,0 mg  $H_3BO_3$ ; 0,04 mg  $Cu(NO_3)_2$ ; 0,24 mg  $ZnSO_4$ ; 0,001 g  $FeCl_3$  (sedikit); 2 ml Bromtymol Blue (0,5% dalam etanol); 5,0 g glukosa; 1,5%-1,8% agar dan akuades 1.000 ml. Media Okon yang telah disiapkan selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri pada suhu sekitar  $50^\circ C$  dengan pH 6,8. *Azospirillum* termasuk bakteri yang tumbuh lambat (*slow growing*), sehingga pengamatan dilakukan sampai hari ke-7 masa inkubasinya. Pengamatan dilakukan terhadap ada dan tidaknya jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Koloni bakteri tersebut berwarna kuning pada media Okon padat yang berwarna hijau atau pertumbuhan bakteri tersebut mengubah warna media Okon setengah padat dari hijau menjadi kuning.

Bakteri *Azospirillum* yang mampu menambat N dalam media Okon, kemudian diuji kemampuan hidupnya pada media Okon yang sama dengan penambahan NaCl sebanyak 2, 4, dan 6%. Penentuan konsentrasi NaCl tersebut berdasarkan hasil-hasil penelitian terdahulu, bahwa ada sejumlah isolat *Azospirillum* spp. yang mampu hidup pada kondisi salinitas sekitar 5%. Pengujian tersebut dilakukan untuk mendapatkan inokulan bakteri *Azospirillum* yang tahan terhadap lahan bersalinitas tinggi, seperti pada ekosistem lahan pesisir atau pantai.

#### **Uji Kualitatif Kemampuan *Azospirillum* dalam Melarutkan P Terikat pada $Ca_3(PO_4)_2$ dalam Media Pikovskaya Padat dan Indeks Efisiensi Pelarutan (IEP) Fosfat**

Isolat bakteri *Azospirillum* ditumbuhkan pada cawan petri yang berisi media Pikovskaya dengan komposisi 5,0 g  $Ca_3(PO_4)_2$ ; 0,5 g  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,2 g NaCl; 0,1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,2 g KCl; 10 g glukosa; 0,5 g ekstrak ragi; 20 g agar; sedikit  $MnSO_4$  dan  $FeSO_4$ ; serta akuades 1.000 ml (Gaur 1981). Bakteri *Azospirillum* yang mampu melarutkan fosfat terikat membentuk zona bening (*holozone*) di sekitar pertumbuhan koloninya. Kemampuannya dalam melarutkan fosfat secara kualitatif dihitung berdasarkan indeks pelarutan fosfat, yaitu diameter koloni bakteri dibagi diameter zona bening (Premono *et al.* 1996, Nguyen *et al.* 1992, dan Seshadri *et al.* 2002).

#### **Uji Kemampuan Kuantitatif Bakteri *Azospirillum* dalam Melarutkan P Terikat pada Media Pikovskaya Cair dan Aktivitas Enzim Fosfomonoesterase (PME-ase) Asam dan Basa serta Kondisi pH Selama Inkubasi 7 hari pada Kultur Murni (pH asal = 7)**

Pengujian menggunakan erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 ml media Pikovskaya cair yang berisi  $Ca_3(PO_4)_2$  sebagai sumber P dengan dosis 5 g/l (Gaur 1981). Tingkat keasaman media tersebut dinetralkan (pH = 7) sebelum diinokulasi. Masing-masing erlenmeyer diinokulasi dengan ekstrak bakteri *Azospirillum* sp. sebanyak 1 ml dengan kepadatan kurang lebih  $10^9$  sel/ml dan perlakuan tanpa  $Ca_3(PO_4)_2$  sebagai kontrol. Erlenmeyer yang berisi biakan tersebut kemudian digoyang dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 1 minggu. Kultur selanjutnya dipanen dan disentrifus selama 10 menit. Fosfat yang dapat larut kemudian diukur menggunakan metode Allen (1974). Larutan yang digunakan dalam metode tersebut ialah campuran larutan ABCD. Larutan A : 14 ml  $H_2SO_4$  + 100 ml akuades; larutan B: 0,324 g K (Sb O)  $C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2}H_2O$  + 100 ml akuades; larutan C: 4 g  $(NH_4)_2Mo_7O_{24}$  + 100 ml akuades; dan larutan D: 1,76 g asam askorbat + 100 ml akuades. Sebanyak 20 ml campuran larutan ABCD yaitu 10 ml A + 1 ml B + 3 ml C + 6 ml D. Sebanyak 3 ml supernatan bakteri hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 0,5 ml campuran *reagent* ABCD tersebut. Fosfat bebas diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 880 nm.  $KH_2PO_4$  digunakan untuk standardisasi berdasarkan ppm yang diinginkan.

Aktivitas fosfomonoesterase (PME-ase asam dan basa) diukur menggunakan metode Tabatabai & Bremner (1969). Sebanyak 1 ml supernatan hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ml substrat p-NPP fosfat 115 mM dan 4 ml *buffer* asetat pH 6,5 untuk PME-ase asam, dan pH 7,5 untuk PME-ase basa. Campuran tersebut kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu  $38^\circ C$ , selanjutnya ditambahkan 1 ml  $CaCl_2$  0,5 M dan dikocok. Prosedur yang sama dilakukan untuk kontrol, tetapi penambahan 1 ml larutan substrat dilakukan setelah penambahan 1 ml  $CaCl_2$  0,5M. Absorban Larutan sampel dan kontrol diukur pada panjang gelombang 400 nm. Larutan 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. Keasaman kultur dan supernatan diukur secara langsung menggunakan pH meter.

## Analisis Kemampuan Bakteri *Azospirillum* sp. dalam Menghasilkan IAA

Analisis IAA menggunakan metode Gravel *et al.* (2007). Media *tryptone soy broth* (TSB) 50% disiapkan dengan mencampurkan 10 g pepton, 2,5 g NaCl, dan 20 g agar dalam 1000 ml akuades. Predursor L-Triptofan sebanyak 200 ppm ditambahkan ke dalam media setelah media disterilkan. Isolat bakteri *Azospirillum* sp. yang sudah murni ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi media TSB. Larutan Salkowski disiapkan dengan mencampurkan 1 ml 0,5 M FeCl<sub>3</sub> ke dalam 50 ml HClO<sub>4</sub> 50% v/v, kemudian disimpan dalam botol yang tidak tembus cahaya/tutup dengan aluminium foil. Larutan FeCl<sub>3</sub> 0,5M disiapkan dengan melarutkan 1,35 g dalam 10 ml akuades; HClO<sub>4</sub> 50% ialah campuran 25 ml HClO<sub>4</sub> dan 25 ml akuades. Setelah *Azospirillum* menunjukkan pertumbuhan, larutan Salkowski diteteskan ke dalam cawan petri tersebut dan diinkubasikan. Pertumbuhan *Azospirillum* sp. diamati setiap hari. Kemampuan bakteri menghasilkan IAA ditandai dengan adanya warna ungu pada media tersebut.

*Azospirillum* sp. di dalam TSB 50% diinkubasikan sambil digoyang menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Hal tersebut dilakukan untuk menyiapkan bahan analisis IAA secara kuantitatif. Sampel kultur sebanyak 1,5 ml diambil pada 0, 1, 2, dan 3 hari setelah inkubasi. Sampel tersebut selanjutnya disentrifus pada kecepatan 8.000 rpm. Sebanyak 1 ml masing-masing supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 2 ml larutan Salkowski, selanjutnya diinkubasikan dalam ruang gelap selama 30 menit. Setelah periode inkubasi, larutan diukur absorbansinya menggunakan panjang gelombang 530 nm, dan hasilnya dibandingkan dengan kurva standar (Tabel 1).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Kualitatif Kemampuan *Azospirillum* dalam Menambat Nitrogen dan Kemampuan Hidup pada Medium Okon Padat yang Mengandung NaCl

Seluruh isolat bakteri yang diuji mampu tumbuh dan menambat nitrogen yang dikandung pada medium Okon padat (Tabel 2). Hal tersebut membuktikan bahwa bakteri B1 sampai dengan B7, PS1, PS2, PS3, FR1 sampai dengan FR14 merupakan *Azospirillum* sp., dan pertumbuhannya sangat baik pada media Okon padat yang mengandung DL asam malat.

Hal serupa juga sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Dobereiner & Day (1976), yaitu menumbuhkan *Azospirillum* sp. di dalam media cair asam malat. Okon *et al.* (1976) dan Konde & Mahendale (1984) mengemukakan bahwa pertumbuhan *Azospirillum* sp. sangat baik, pada media Okon yang mengandung asam malat, asam suksinat, asam purivat, galaktosa, dan asetat.

Hasil uji ketahanan hidup bakteri pada media Okon yang salinitasnya berbeda melalui penambahan NaCl pada dosis 0, 2, 4, dan 6% disajikan dalam Tabel 3. Isolat-isolat bakteri, yaitu B1, B2, B3, B4, B6, B14, B15, B16, B17, PS1, PS2, FR1, FR5, FR7, FR8, FR10, FR12, dan FR13 mampu tumbuh pada media Okon dengan konsentrasi NaCl sampai 6%. Isolat-isolat B5, B12, dan FR3 mampu tumbuh pada media tersebut dengan konsentrasi NaCl sampai 4%, sedang isolat B7, B13, dan FR11 menunjukkan pertumbuhan pada konsentrasi NaCl sampai 2%. Isolat-isolat bakteri lainnya tidak mampu tumbuh pada salinitas media yang diuji. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak semua bakteri *Azospirillum* spp. mampu tumbuh atau hidup pada ekosistem yang salinitasnya tinggi.

Seluruh isolat bakteri *Azospirillum* spp. yang diisolasi dari ekosistem pantai dapat tumbuh dengan baik pada media Okon yang mengandung NaCl, karena bakteri tersebut terbiasa dengan habitat bersalinitas tinggi (Tabel 3). Lain halnya dengan isolat yang berasal dari dataran tinggi, seperti dari area Gunung Salak (Bogor, Jawa Barat), Bedugul (Bali), dan Freeport (Papua), kemampuan tumbuh pada media yang mengandung NaCl menunjukkan keragaman.

Menurut Holt *et al.* (2000), ada beberapa spesies *Azospirillum* yang dapat tumbuh pada salinitas NaCl 3%, seperti jenis *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, dan *A. irakense*, dan ada yang tidak dapat tumbuh pada tingkat salinitas tersebut, seperti jenis *A. amazonense*. Namun demikian, bakteri *A. brasilense* menunjukkan kemampuan untuk tumbuh pada salinitas NaCl sampai 4% (Ravikumar *et al.* 2002).

### Uji Kualitatif Kemampuan *Azospirillum* dalam Melarutkan P Terikat pada Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dalam Media Pikovskaya Padat dan Indeks Efisiensi Pelarutan (IEP) Fosfat

Hasil uji kemampuan bakteri *Azospirillum* dalam melarutkan P terikat pada Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dalam media Pikovskaya padat menunjukkan bahwa tidak semua

**Tabel 1.** Nilai kurva standar untuk pembandingan hasil analisis IAA (*Values for the standard curve for comparison of IAA analysis*)

| Ppm          | 0 | 5    | 10  | 15   | 20 | 25   | 30  | 35   | 40 | 45   | 50  |
|--------------|---|------|-----|------|----|------|-----|------|----|------|-----|
| IAA (ml)     | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1  | 1,25 | 1,5 | 1,75 | 2  | 2,25 | 2,5 |
| TSB 50% (ml) | 5 | 4,75 | 4,5 | 4,25 | 4  | 3,75 | 3,5 | 3,25 | 3  | 2,75 | 2,5 |

**Tabel 2. Uji kualitatif kemampuan bakteri *Azospirillum* dalam menambat nitrogen pada medium Okon padat (*The qualitative test of Azospirillum bacteria to fix up nitrogen on solid Okon medium*)**

| Kode (Code) | Asal bakteri/komoditas ( <i>Site of origin/commodity</i> ) | Kemampuan tumbuh ( <i>Ability of growth</i> )* |
|-------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| B1          | Pantai Amed, Bali (mangrove)                               | +                                              |
| B2          | Pantai Rambut Siwi, Bali (mangrove)                        | +                                              |
| B3          | Pantai Badung, Bali (mangrove)                             | +                                              |
| B4          | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)                 | +                                              |
| B5          | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik/padi)         | +                                              |
| B6          | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)                 | +                                              |
| B7          | Ladang rakyat, Bedugul (tomat ceri)                        | +                                              |
| B8          | Persawahan Jembrana, Bali (padi)                           | +                                              |
| B9          | Kebun Raya Bali (cemara)                                   | +                                              |
| B10         | Kebun Raya Bali (jeungjing)                                | +                                              |
| B11         | Persawahan G. Salak (padi ketan)                           | +                                              |
| B12         | Perkebunan G. Salak (kopi)                                 | +                                              |
| B13         | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik/padi)         | +                                              |
| B14         | Ladang rakyat, Bedugul (salak)                             | +                                              |
| B15         | Ladang rakyat, Bedugul (stroberi)                          | +                                              |
| B16         | Ladang rakyat, Bedugul (bit)                               | +                                              |
| B17         | Perkebunan G. Salak (teh)                                  | +                                              |
| PS1         | Cengkareng (bayam)                                         | +                                              |
| PS2         | Cengkareng (kangkung)                                      | +                                              |
| PS3         | Pesisir pulau Laki (lamtoro gung)                          | +                                              |
| FR1         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR2         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR3         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR4         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR5         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR6         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR7         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR8         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR9         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR10        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR11        | Freeport, Papua (serasah)                                  | +                                              |
| FR12        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR13        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |
| FR14        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                              |

\*+ = Mampu tumbuh dan menambat nitrogen pada medium Okon padat (*Able to grow and fix nitrogen on solid Okon medium*)

*Azospirillum* spp. membentuk zona bening (*holozone*) di sekitar koloninya. Hal tersebut membuktikan bahwa tidak semua bakteri *Azospirillum* yang diuji dapat melarutkan unsur P yang terikat (Tabel 4).

Isolat-isolat *Azospirillum* spp. yang dapat melarutkan P terikat secara kualitatif ialah B1 sampai dengan B6, B12, B13, B14, B17, PS1, PS2, PS3, FR1, FR3, FR5, FR7, FR8, FR10, FR12, FR13 dengan IEP fosfat yang bervariasi, masing-masing sebesar 85, 120, 90, 160, 50, 140, 100, 70, 110, 80, 85, 120, 80, 60, 80, 60, 80, 70, 85, 80, dan 100. Luas zona bening yang terbentuk menunjukkan besar kecilnya kemampuan bakteri membebaskan P dari ikatan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  secara kualitatif (Rachmiati 1995). Aktivitas bakteri *Azospirillum* dalam melarutkan P dari ikatan tersebut terjadi karena adanya pelarutan partikel halus dari  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Keberhasilan proses pelarutan tersebut bergantung pada temperatur, kelembaban, pH, suplai makanan, dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan mikrob dalam kultur cair.

#### **Uji Kemampuan Kuantitatif Bakteri *Azospirillum* dalam Melarutkan P Terikat dalam Media Pikovskaya Cair dan Aktivitas Enzim Fosfomonoesterase (PME-ase) Asam dan Basa serta Kondisi pH Selama Inkubasi 7 Hari pada Kultur Murni (pH asal = 7)**

Isolat-isolat yang mampu melarutkan P terikat pada  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dalam medium cair disajikan dalam Tabel 5. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut juga mampu hidup pada salinitas tinggi, yaitu pada NaCl 4–6% (Tabel 3). Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari ekosistem basah yang bersalinitas tinggi, yaitu pantai dan lepas pantai, mampu melarutkan P dari ikatan seng fosfat sebesar 30%, sebesar 19% dari ikatan kalsium fosfat, dan sebesar 18% dari ikatan trikalsiumfosfat (Seshadri 2002), serta mampu melarutkan P dari ikatan  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$  sebesar 18,59 mg/l, sebesar 18,31 mg/l dari  $\text{Al}_2(\text{PO}_4)_3$ , dan sebesar 7,4 mg/l dari *rock phosphate* (Widawati 2011).

**Tabel 3. Kemampuan tumbuh *Azospirillum* pada media Okon yang mengandung NaCl (*Grow ability of Azospirillum in NaCl containing Okon Media*)**

| Kode<br>(Code) | Asal bakteri/komoditas ( <i>Site of origin/commodity</i> ) | Konsentrasi NaCl dalam media Okon<br>( <i>NaCl concentrations in Okon media</i> ), % * |   |   |   |
|----------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|
|                |                                                            | 0                                                                                      | 2 | 4 | 6 |
| B1             | Pantai Amed, Bali (mangrove)                               | +                                                                                      | + | + | + |
| B2             | Pantai Rambut Siwi, Bali (mangrove)                        | +                                                                                      | + | + | + |
| B3             | Pantai Badung, Bali (mangrove)                             | +                                                                                      | + | + | + |
| B4             | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)                 | +                                                                                      | + | + | + |
| B5             | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik/padi)         | +                                                                                      | + | + | - |
| B6             | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)                 | +                                                                                      | + | + | + |
| B7             | Ladang rakyat, Bedugul (tomat ceri)                        | +                                                                                      | + | - | - |
| B8             | Persawahan Jembrana, Bali (padi)                           | +                                                                                      | - | - | - |
| B9             | Kebun Raya Bali (cemara)                                   | +                                                                                      | - | - | - |
| B10            | Kebun Raya Bali (jeungjing)                                | +                                                                                      | - | - | - |
| B11            | Persawahan G. Salak (padi ketan)                           | +                                                                                      | - | - | - |
| B12            | Perkebunan G. Salak (kopi)                                 | +                                                                                      | + | + | - |
| B13            | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik/ padi)        | +                                                                                      | + | - | - |
| B14            | Ladang rakyat, Bedugul (salak)                             | +                                                                                      | + | + | + |
| B15            | Ladang rakyat, Bedugul (stroberi)                          | +                                                                                      | - | - | - |
| B16            | Ladang rakyat, Bedugul (bit)                               | +                                                                                      | - | - | - |
| B17            | Perkebunan G. Salak (teh)                                  | +                                                                                      | + | + | + |
| PS1            | Cengkareng (bayam)                                         | +                                                                                      | + | + | + |
| PS2            | Cengkareng (kangkung)                                      | +                                                                                      | + | + | + |
| PS3            | Pesisir pulau Laki (lamtoro gung)                          | +                                                                                      | + | + | + |
| FR1            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |
| FR2            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | - | - | - |
| FR3            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | - |
| FR4            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | - | - | - |
| FR5            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |
| FR6            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | - | - | - |
| FR7            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |
| FR8            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |
| FR9            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | - | - | - |
| FR10           | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |
| FR11           | Freeport, Papua (serasah)                                  | +                                                                                      | + | - | - |
| FR12           | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |
| FR13           | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                                                                      | + | + | + |

\* += Mampu tumbuh (*Able to grow*) dan - = Tidak mampu tumbuh (*Not able to grow*)

Konsentrasi P tersedia serta aktivitas enzim PME-ase asam dan basa meningkat selama inkubasi (Tabel 5). Peningkatan aktivitas tersebut terjadi karena adanya proses induksi pada saat jumlah P terbatas dalam media Pikovskaya dan pada saat bakteri tumbuh, sehingga membutuhkan P yang tinggi (Savin *et al.* 2000). Selama pertumbuhan dalam media Pikovskaya, bakteri pelarut fosfat secara genetik mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam menghasilkan jumlah dan jenis asam organik. Menurut Tatiek (1991), jumlah dan jenis asam organik berperan dalam tinggi rendahnya pelarutan P.

Konsentrasi P tersedia tertinggi hasil pelarutan P terikat pada  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$  dalam media Pikovskaya cair dihasilkan oleh bakteri *Azospirillum* B4 (5,80 mg/l), B6 (5,84 mg/l), dan PS2 (5,45 mg/l) serta diikuti hasil tertinggi dalam aktivitas enzim fosfatase asam (B4 = 0,58 mg p-nitrofenol m/l; B6 = 0,58 mg p-nitrofenol m/l; PS2 = 0,57 mg p-nitrofenol m/l) dan basa (B4 = 0,52 mg p-nitrofenol m/l; B6 = 0,50 mg p-nitrofenol/

ml; PS2 = 0,48 mg p-nitrofenol m/l) serta diikuti dengan penurunan pH dari pH asal (7) menjadi 4,20 (B4); 430 (B6); dan 4,22 (PS2). Penurunan pH terjadi karena absorpsi glukosa pada aktivitas bakteri pelarut fosfat dalam pembebasan asam-asam organik, seperti asam sitrat, glutamat, suksinat, laktat, oksalat, glikooksalat, malat, fumarat, tartarat, dan asam alfa ketobutirat yang meningkat. Proses tersebut mengakibatkan terjadinya pelarutan Ca-fosfat dan membentuk khelat (komplek stabil) dengan kation Al, Fe, dan Ca yang mengikat P, sehingga P tersedia dalam bentuk ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  yang dapat diserap oleh tanaman (Kucey 1983).

Proses pelarutan P terikat oleh bakteri pelarut fosfat dalam media Pikovskaya cair melibatkan penurunan pH. Hal tersebut terjadi karena hasil sintesis senyawa organik yang dilepaskan ke dalam medium Pikovskaya, kemudian terjadi proses oksidasi, reduksi, dan kompetisi ligan organik (Cunningham & Kuiack 1992). Hal yang sama terjadi pada percobaan Jong-soo *et al.* (2007) bahwa bakteri pelarut fosfat dapat

**Tabel 4. Kemampuan isolat *Azospirillum* dalam melarutkan P terikat dalam media Pikovskaya padat dan IEP fosfat (*The ability of Azospirillum isolates on solubilizing bounded P in solid Pikovskaya media, and its phosphate solubility efficiency index*)**

| Kode (Code) | Asal bakteri/komoditas ( <i>Site of origin/commodity</i> ) | Kemampuan tumbuh ( <i>Grow ability</i> )* | IEP ( <i>Phosphate solubility efficiency index</i> ) |
|-------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| B1          | Pantai Amed, Bali (mangrove)                               | +                                         | 85                                                   |
| B2          | Pantai Rambut Siwi, Bali (mangrove)                        | +                                         | 120                                                  |
| B3          | Pantai Badung, Bali (mangrove)                             | +                                         | 90                                                   |
| B4          | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)                 | +                                         | 160                                                  |
| B5          | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik/padi)         | +                                         | 50                                                   |
| B6          | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)                 | +                                         | 140                                                  |
| B7          | Ladang rakyat, Bedugul (tomat ceri)                        | -                                         | -                                                    |
| B8          | Persawahan Jembrana, Bali (padi)                           | -                                         | -                                                    |
| B9          | Kebun Raya Bali (cemara)                                   | -                                         | -                                                    |
| B10         | Kebun Raya Bali (jeungjing)                                | -                                         | -                                                    |
| B11         | Persawahan G. Salak (padi ketan)                           | -                                         | -                                                    |
| B12         | Perkebunan G. Salak (kopi)                                 | +                                         | 100                                                  |
| B13         | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik/padi)         | +                                         | 70                                                   |
| B14         | Ladang rakyat, Bedugul (salak)                             | +                                         | 110                                                  |
| B15         | Ladang rakyat, Bedugul (stroberi)                          | -                                         | -                                                    |
| B16         | Ladang rakyat, Bedugul (bit)                               | -                                         | -                                                    |
| B17         | Perkebunan G. Salak (teh)                                  | +                                         | 80                                                   |
| PS1         | Cengkareng (bayam)                                         | +                                         | 85                                                   |
| PS2         | Cengkareng (kangkung)                                      | +                                         | 120                                                  |
| PS3         | Pesisir pulau Laki (lamtoro gung)                          | +                                         | 80                                                   |
| FR1         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 60                                                   |
| FR2         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | -                                         | -                                                    |
| FR3         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 80                                                   |
| FR4         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | -                                         | -                                                    |
| FR5         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 60                                                   |
| FR6         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | -                                         | -                                                    |
| FR7         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 80                                                   |
| FR8         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 70                                                   |
| FR9         | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | -                                         | -                                                    |
| FR10        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 85                                                   |
| FR11        | Freeport, Papua (serasah)                                  | -                                         | -                                                    |
| FR12        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 80                                                   |
| FR13        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | +                                         | 100                                                  |
| FR14        | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                         | -                                         | -                                                    |

\* += Mampu tumbuh dan melarutkan P terikat (*Able to grow and solubilize P*); dan - = Tidak mampu tumbuh (*Not able to grow*)

melarutkan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  setelah diinkubasi selama 5 hari dengan pH awal sebesar 7 yang menurun menjadi 4,4. Demikian pula hasil percobaan Widawati (2011a) yang menunjukkan bahwa bakteri pelarut fosfat dapat melarutkan P yang terikat pada  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Al}_2(\text{PO}_4)_3$ , dan *rock phosphate* setelah diinkubasi selama 7 hari dengan pH awal 7 kemudian turun menjadi 2,6; 2,8; dan 4,2. Dengan demikian, penurunan pH kultur cair merupakan mekanisme penting pada pelarutan P terikat menjadi tersedia (Perez *et al.* 2007). Whitelaw *et al.* (1999) mengemukakan bahwa perubahan pH pada konsentrasi fosfat terlarut dalam media kultur secara langsung sebanding dengan kemasaman dan konsentrasi asam oleh produksi asam organik (asam asetat, sitrat, dan oksalat).

Mekanisme pelarutan fosfat oleh aktivitas mikrob pelarut fosfat, yaitu *Azospirillum* sp., pada  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dan  $\text{Al}(\text{PO}_4)_3$  berkaitan dengan kemampuan mikrob tersebut dalam menghasilkan enzim fosfatase dan

asam-asam organik seperti suksinat, asetat, propionat, glikolat, fumarat, oksalat, laktat, ketoglutarat (Rao 1982). Glukosa yang terkandung dalam media tumbuh bakteri pelarut fosfat (Pikovskaya), digunakan oleh bakteri tersebut untuk aktivitas PME-ase asam dan basa, serta terabsorpsi dan ditransfer ke dalam biomasa. Proses tersebut dikenal sebagai *yield coefficient* (YC). Besarnya nilai YC berbeda-beda untuk masing-masing jenis bakteri pelarut fosfat. Hal tersebut juga sama dengan hasil pengukuran aktivitas enzim fosfatase yang berbeda-beda dari isolat-isolat *Azospirillum* sp. yang mampu tumbuh pada salinitas tinggi dan mempunyai zona bening di sekitar koloninya, tapi semua bakteri dapat menghasilkan enzim PME-ase asam dan basa. Hal tersebut memperlihatkan bahwa bakteri tersebut mampu menggunakan senyawa organik yaitu  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  yang terdapat dalam media Pikovskaya sebagai sumber fosfat. Ramachandran *et al.* (2007) menyatakan bahwa bakteri yang dapat

**Tabel 5. Konsentrasi P tersedia, aktivitas enzim PME-ase asam dan basa serta kondisi pH selama inkubasi 7 hari pada kultur murni (pH asal = 7)(Concentrations of available P, activities of acid and base PME-ase, and pH levels during 7 days incubation on pure media)**

| Kode<br>(Code) | Asal bakteri/komoditas<br>(Site of origin/Commodity) | P tersedia<br>(Available P)<br>mg/l | Aktivitas enzim fosfatase<br>(Activity of phosphatase enzyme)<br>mg p-nitrofenol /ml |             | pH       |
|----------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------|
|                |                                                      |                                     | Asam (Acid)                                                                          | Basa (Base) |          |
| B1             | Pantai Amed, Bali (mangrove)                         | 5,73 b                              | 0,48 b                                                                               | 0,48 b      | 4,70 bcd |
| B2             | Pantai Rambut Siwi, Bali (mangrove)                  | 5,60 c                              | 0,57 a                                                                               | 0,43 c      | 5,08 b   |
| B3             | Pantai Badung, Bali (mangrove)                       | 5,38 e                              | 0,56 a                                                                               | 0,41 c      | 4,80 bc  |
| B4             | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)           | 5,80 a                              | 0,58 a                                                                               | 0,52 a      | 4,20 e   |
| B5             | Posanten, Jembrana, Bali (persawahan organik)        | 4,67 g                              | 0,49 b                                                                               | 0,44 c      | 5,03 b   |
| B6             | Pantai Rambut Siwi, Bali (persawahan/padi)           | 5,84 a                              | 0,58 a                                                                               | 0,50 a      | 4,30 de  |
| B12            | Perkebunan G. Salak (kopi)                           | 5,46 d                              | 0,48 b                                                                               | 0,44 c      | 4,40 cde |
| B14            | Ladang rakyat, Bedugul (salak)                       | 5,73 b                              | 0,58 a                                                                               | 0,48 b      | 4,71 bcd |
| B17            | Perkebunan G. Salak (teh)                            | 5,45 d                              | 0,47 b                                                                               | 0,42 c      | 4,70 bcd |
| PS1            | Cengkareng (bayam)                                   | 5,34 f                              | 0,49 b                                                                               | 0,44 c      | 5,06 b   |
| PS2            | Cengkareng (kangkung)                                | 5,45 a                              | 0,57 a                                                                               | 0,48 b      | 4,22 e   |
| PS3            | Pesisir pulau Laki (lamtoro gung)                    | 4,52 h                              | 0,38 c                                                                               | 0,46 c      | 5,93 a   |
| FR1            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 3,30 i                              | 0,33 c                                                                               | 0,28 d      | 5,70 a   |
| FR3            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 4,67 g                              | 0,36 c                                                                               | 0,29 d      | 5,80 a   |
| FR5            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 4,51 h                              | 0,39 c                                                                               | 0,27 d      | 5,75 a   |
| FR7            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 1,62 j                              | 0,37 c                                                                               | 0,21 e      | 5,90 a   |
| FR8            | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 3,33 i                              | 0,34 c                                                                               | 0,42 c      | 5,78 a   |
| FR10           | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 4,51 h                              | 0,35 c                                                                               | 0,22 e      | 5,89 a   |
| FR12           | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 5,33 f                              | 0,49 b                                                                               | 0,43 c      | 5,84 a   |
| FR13           | Freeport, Papua (rumpun dan lumut)                   | 1,60 j                              | 0,38 c                                                                               | 0,20 e      | 5,82 a   |

Keterangan (Remarks) : Angka rerata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5% (Mean followed by the same letter on the same column are not significant different according to DMRT test at 5% level)

mengeluarkan fosfat anorganik dari  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dalam medium cair merupakan bakteri yang potensial dalam melarutkan P terikat menjadi P tersedia bagi tanaman.

#### Analisis Kemampuan Bakteri *Azospirillum* sp. Menghasilkan IAA

Hasil analisis kemampuan bakteri *Azospirillum* sp. dalam menghasilkan IAA dapat dilihat dalam Tabel 6. Analisis dilakukan pada seluruh *Azospirillum* yang diperoleh dari isolasi pertama, yaitu bakteri yang dapat menambat nitrogen dalam media Okon padat (Tabel 2). Hasilnya menunjukkan bahwa semua *Azospirillum* mampu menghasilkan IAA meskipun konsentrasinya tidak tinggi. Hasil tertinggi dari konsentrasi IAA pada penelitian ini, yaitu pada pengamatan 0–3 hari, dihasilkan oleh *Azospirillum* sp. dengan kode B4 ( $\text{H}_0 = 0,1371$  ppm; optical density (OD) 0,1769;  $\text{H}_1 = 0,6749$  ppm, OD 0,7766;  $\text{H}_2 = 0,1475$  ppm, OD 1,1475;  $\text{H}_3 = 0,3678$  ppm, OD 0,7837); B6 ( $\text{H}_0 = 0,1576$  ppm, OD 1,337;  $\text{H}_1 = 0,4694$  ppm, OD 0,7413;  $\text{H}_2 = 0,3910$  ppm, OD 1,1364; dan  $\text{H}_3 = 0,3434$  ppm, OD 0,7837). Bakteri lain yang diuji juga mampu menghasilkan IAA, yaitu B17, PS1, dan PS3. Bakteri B4, B6, dan B17 mampu menghasilkan IAA dan mencapai nilai optimum pada hari ke-1, yaitu masing-masing sebesar 0,6749, 0,4694, dan 0,4253 ppm, dan menurun pada hari ke-2 dan semakin turun pada hari ke-3, sedangkan bakteri PS1 dan PS3 mampu menghasilkan IAA dan mencapai nilai optimum pada

hari ke-2 (0,3911 dan 0,3612 ppm), kemudian menurun pada hari ke-3. Dengan demikian, terlihat bahwa tingkat konsentrasi IAA tertinggi umumnya diikuti dengan tingkat konsentrasi yang lebih rendah pada hari berikutnya. Tien *et al.* (1979) melaporkan bahwa produksi IAA oleh *A. brasilense* meningkat seiring dengan umur bakteri sampai fase stasioner. Setelah periode kenaikan IAA, nutrisi mengalami penurunan, tetapi *Azospirillum* masih mampu memproduksi IAA dan secara simultan juga mengonsumsi IAA untuk pertumbuhannya, meskipun medium pertumbuhan sudah miskin nutrisi. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa turunnya kandungan IAA yang dihasilkan terkait dengan penurunan pH pada aktivitas enzim. Semakin rendah pH, maka aktivitas enzim dalam memproduksi IAA semakin menurun. Tingginya nilai OD tidak menentukan besarnya konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh *Azospirillum*. Kemungkinan hal tersebut disebabkan oleh metode pengukuran OD yang hanya mendeteksi tingkat kekeruhan ekstrak, sehingga bakteri yang sudah mati pun dalam ekstrak tersebut turut terdeteksi. *Indole acetic acid* merupakan fitohormon penting yang diproduksi oleh *Azospirillum* (Oda & Vanderleyden 2000, Okon & Kapulnik 1986). Oleh karena itu, skrining berbagai karakter fungsional *Azospirillum* dipandang perlu untuk mengetahui seberapa jauh manfaatnya sebagai *plant growth promoting rhizobacteria*.

**Tabel 6. Kemampuan isolat *Azospirillum* spp. dalam menghasilkan IAA (*The ability of *Azospirillum* sp. to produce IAA*)**

| Kode<br>(Code) | Hari ke-0 (Day 0) |           | Hari ke-1 (Day 1) |             | Hari ke-2 (Day 2) |             | Hari ke-3 (Day 3) |             |
|----------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                | IAA               | OD        | IAA               | OD          | IAA               | OD          | IAA               | OD          |
| B1             | 0,1295 a          | 0,1871 ab | 0,1403 a          | 0,1974 abc  | 0,160.1 a         | 0,1802 ab   | 0,1792 abcd       | 0,4079 cde  |
| B2             | 0,1456 a          | 0,1486 ab | 0,1959 ab         | 0,5980 fghi | 0,174.2 ab        | 0,8393 cde  | 0,2029 abcde      | 0,1473 cd   |
| B3             | 0,1318 a          | 0,16 ab   | 0,1437 a          | 0,1799 abc  | 0,280.5 ab        | 0,9535 cde  | 0,1249 abc        | 0,2503 cd   |
| B4             | 0,1641 a          | 0,1769 ab | 0,6749 f          | 0,7766 i    | 0,3854 b          | 1,1475 e    | 0,3678 f          | 0,7837 e    |
| B5             | 0,1244 a          | 0,0675 a  | 0,1505 ab         | 0,2078 abc  | 0,1424 a          | 0,4272 abc  | 0,1148 ab         | 0,3071 cde  |
| B6             | 0,1576 a          | 0,1337 ab | 0,4694 e          | 0,7413 i    | 0,3910 b          | 1,1364 e    | 0,3434 ef         | 0,7837 e    |
| B7             | 0,1298 a          | 0,1029 ab | 0,532 ab          | 0,2041 abc  | 0,2975 ab         | 0,7525 cde  | 0,1398 abc        | 0,1198 cd   |
| B8             | 0,1696 a          | 0,1445 ab | 0,1426 a          | 0,1526 ab   | 0,1364 a          | 0,0867 a    | 0,1074 ab         | 0,3307 cde  |
| B9             | 0,1434 a          | 0,1281 ab | 0,1730 ab         | 0,3710 cde  | 0,1504 a          | 0,6662 bcde | 0,0308 a          | 0,5984 cde  |
| B10            | 0,1323 a          | 0,1282 ab | 0,1389 a          | 0,0913 a    | 0,1505 a          | 0,6633 bcde | 0,1664 abcd       | 0,368 cde   |
| B11            | 0,1520 a          | 0,1146 ab | 0,1467 a          | 0,1754 abc  | 0,1428 a          | 0,4897 abc  | 0,1321 abc        | 0,3620 c de |
| B12            | 0,1351 a          | 0,1124 ab | 0,3347 d          | 0,5299 efgh | 0,2720 ab         | 0,7764 cde  | 0,2597bcdef       | 0,2315 cd   |
| B13            | 0,1297 a          | 0,1042 ab | 0,1438 a          | 0,0746 a    | 0,2344 ab         | 0,7308 cde  | 0,1199 ab         | 0,4450 cde  |
| B14            | 0,1553 a          | 0,1929 ab | 0,1164 a          | 0,6235 fghi | 0,2509 ab         | 0,8211 cde  | 0,2091 abcde      | 0,2431 cd   |
| B15            | 0,1321 a          | 0,1063 ab | 0,2069 bc         | 0,6796 hi   | 0,2226 ab         | 0,675 bcde  | 0,2121 abcdef     | 0,2323 cd   |
| B16            | 0,1289 a          | 0,1063 ab | 0,1920 ab         | 0,6003 fghi | 0,2213 ab         | 0,5066 abcd | 0,2207 abcdef     | 0,5207 cde  |
| B17            | 0,1560 a          | 0,1284 ab | 0,4253 e          | 0,6362 ghi  | 0,2759 ab         | 0,9384 cde  | 0,2779 cdef       | 0,4869 cde  |
| PS1            | 0,1282 a          | 0,1385 ab | 0,3460 d          | 0,6888 hi   | 0,3911 b          | 1,0953 de   | 0,3330 ef         | 0,6213 de   |
| PS2            | 0,1361 a          | 0,1096 ab | 0,2277 bc         | 0,5864 fghi | 0,2307 ab         | 0,8193 cde  | 0,1455 abc        | 0,1895 cd   |
| PS3            | 0,1568 a          | 0,1523 ab | 0,2898 cd         | 0,6969 hi   | 0,3612 b          | 1,0724 de   | 0,3168 def        | 0,4869 cde  |
| FR1            | 0,1456 a          | 0,1290 ab | 0,2440 bc         | 0,5852 fghi | 0,2822 ab         | 0,7369 cde  | 0,1454 abc        | 0,1279 cd   |
| FR2            | 0,1600 a          | 0,1575 ab | 0,1672 ab         | 0,5485 efgh | 0,1865 ab         | 0,5248 abcd | 0,1543 abc        | 0,2806 cde  |
| FR3            | 0,1394 a          | 0,1349 ab | 0,1701 ab         | 0,1121 a    | 0,1771 ab         | 0,8417 cde  | 0,1315 abc        | 0,2973 cde  |
| FR4            | 0,1626 a          | 0,1323 ab | 0,1646 ab         | 0,2334 abce | 0,2366 ab         | 0,5285 abcd | 0,2294 abcdef     | 0,4344 cde  |
| FR5            | 0,1626 a          | 0,1437 ab | 0,2250 bc         | 0,1899 abc  | 0,1554 ab         | 0,4966 abc  | 0,1621 abcd       | 0,1921 cd   |
| FR6            | 0,1300 a          | 0,1324 ab | 0,1471 a          | 0,1863 abc  | 0,2405 ab         | 0,6344 bcde | 0,1437 abc        | 0,4102 cde  |
| FR7            | 0,1398 a          | 0,1670 ab | 0,2345 bc         | 0,3594 bcde | 0,2394 ab         | 0,8891 cde  | 0,1247 abc        | 0,1921 cd   |
| FR8            | 0,1339 a          | 0,0908 a  | 0,2538 bc         | 0,5967 fghi | 0,2309 ab         | 0,5264 abcd | 0,2423 abcdef     | 0,2869 cde  |
| FR9            | 0,1342 a          | 0,1473 ab | 0,1914 ab         | 0,4247 def  | 0,1553 a          | 0,7483 cde  | 0,1236 abc        | 0,0907 c    |
| FR10           | 0,1311 a          | 0,8123 c  | 0,1970 ab         | 0,1407 a    | 0,2667 ab         | 0,7021 cde  | 0,1422 abc        | 0,2684 cd   |
| FR11           | 0,1355 a          | 0,1149 ab | 0,1666 ab         | 0,6003 fghi | 0,1789 ab         | 0,9924 cde  | 0,2381 abcdef     | 0,2261 cd   |
| FR12           | 0,1371 a          | 0,1160 ab | 0,2037 bc         | 0,2197 abc  | 0,1601 a          | 0,8517 cde  | 0,2587 bcdef      | 0,2127 cd   |
| FR13           | 0,1393 a          | 0,1409 ab | 0,1458 a          | 0,4342 defg | 0,2020 ab         | 0,7957 cde  | 0,1413 abc        | 0,4327 cde  |
| FR14           | 0,1289 a          | 0,1450 ab | 0,1542 ab         | 0,0643 a    | 0,1953 ab         | 0,6023 bcde | 0,1148 ab         | 0,2093 cd   |

## KESIMPULAN

- Semua isolat *Azospirillum* spp. yang diisolasi dari semua ekosistem mampu menambat nitrogen pada media Okon padat;
- Isolat B4 dan B6 yang diisolasi dari lahan sawah (Rambut Siwi Pantai, Bali) mampu menghasilkan IAA tertinggi, masing-masing sebesar 0,6749 dan 0,4694 ppm (hari pertama), 0,3854 dan 0,3910 ppm (hari kedua), 0,3678 dan 0,3434 ppm (hari ketiga);
- Isolat B1, B2, B3, B4, B6, B14, B17, PS1, PS2, PS3, FR1, FR5, FR7, FR8, FR10, FR12, dan FR13 mampu tumbuh dalam medium Okon dengan dosis NaCl 0 sampai dengan 6%;
- Isolat B2, B4, B6, B12, B14, PS2, dan FR13 mampu melarutkan P yang terikat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dalam medium padat Pikovskaya dengan nilai IEP fosfat masing-masing sebesar 120, 160, 140, 100, 110, 120, dan 100;
- Isolat B4, B6, dan PS2 menghasilkan konsentrasi P terlarut tertinggi, yaitu 5,80; 5,8; dan 5,45 mg/l dengan konsentrasi PME-ase 0,58; 0,58; 0,57 u/ml

(asam); 0,52; 0,50; 0,48 mg/l (basa), dan pH 4,20; 4,30; dan 4,22;

- Azospirillum* sp. berpotensi sebagai *plant growth promoting bacteria* yang bisa diterapkan pada pertanian tepi pantai.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada proyek DIKTI atas dukungan pembiayaan dalam pelaksanaan penelitian ini.

## PUSTAKA

- Akbari, Gh. Abbas, Arab, SM, Alikhani, HA, Allahdadi & Arzanesh MH 2007, 'Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots', *World J. Agric. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 523-29.
- Allen, SE 1974, *Chemical analysis of ecological materials*. Blackwell Sci. Pub., Oxford.
- Cunningham, JE & Kuiaick, C 1992, 'Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilail*', *Appl. Environ. Microbial.*, vol. 58, pp. 1451-58.

4. Dobereiner, J & Day, JM 1976, *Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
5. Eckert, BOB, Weber, Kirchhof, G, Halbritter, A, Stoffels, M & Hartmann, A 2011, '*Azospirillum dobereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass. *Miscanthus Interm*', *J. Systematic and Evolutionary Microbiol.*, vol. 51, pp. 17-26.
6. Gravel, V, Antoun, H & Tweddell, RJ 2007, 'Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA)', *Soil Biol. Biochem.*, vol. 39, pp. 1968-77.
7. Glick, BR 1995, 'The enhancement of plant growth by free-living bacteria', *Can. J. Microbiol.*, vol. 41, pp. 109-17.
8. Gaur, AC 1981, *Phospho-microorganism and variants transformation in compost technology*, Project Field Document No. 13 FAO.
9. Holt, JG, Krieg, NR, Peter, HA, Sneath, Staley, JT & Staley T Williams 2000, *Bergey's Manual of determinative bacteriology ninth edition*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
10. Jong-Soo Jeon, Sang-Soo Lee, Hyoun-Young Kim, Tae-Seok Ahn & Hong-Gyu Song. 2007, 'Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms', *The J. Microbiol.*, vol. 41, no. 4, pp. 271-76.
11. Khairul, U 2001, *Pemanfaatan bioteknologi untuk peningkatan produksi pertanian*, diunduh tanggal 31 Oktober 2011, <<http://www.worddagroforestry.org/sea/publocation/files/book/BK0028pdf>>.
12. Konde, BK & Mahendale, RK 1984, 'Utilization of carbon and nitrogenous compounds by diazotroph fixing *Azospirillum* Strain', *Indian J. Microbiol.*, vol. 24, no. 1, pp. 44-6.
13. Kucey, RMN 1983, 'Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils', *Can. J. Soil Sci.*, vol. 63, pp. 671-78.
14. Lal, L 2002, *Phosphate biofertilizers* Agrotech Publ. Academy, Udaipur, India.
15. Miharja, OAA 2003, *Peningkatan pertumbuhan dan hasil kedelai serta efisiensi pemupukan fosfat sebagai akibat pemberian pupuk hayati pada tanah Ultisol Jatiningor*, diunduh tanggal 31 Oktober 2011, <<http://www.goggle.co.id>>.
16. Nursoid 2008, *Kemampuan Azospirillum sp. JG3 dalam menghasilkan lipase pada medium campuran dedak dan onggok dengan waktu inkubasi berbeda*, Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerta.
17. Nguyen, C, Yan, W, Tacon, FL & Lapeyrie, F 1992, 'Genetic viability of phosphatesolubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D.Orton', *Plant Soil*, vol. 143, pp. 193-99.
18. Oda, S & Vanderleyden, J 2000, '*Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses genetic, biochemical and ecological aspects', *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 24, pp. 487-506.
19. Okon, Y, Albrecht, SL & Barris, RH 1976, 'Factor affecting growth and nitrogen fixation of *Azospirillum lipoferum*', *J. Bacteriol.*, vol. 127, no. 3, pp. 1248-54.
20. Okon, Y 1985, '*Azospirillum* as a potential inoculants for agriculture', *Trends in Biotechnol.*, vol. 3, pp. 223-28.
21. Okon, Y & Kalpunik, Y 1986, 'Development and function of *Azospirillum* inoculated roots', *Plant and soil*, vol. 90, pp. 3-16.
22. Perez E, Sulbaran M, Ball, MM & Yarzabal, LA 2007, 'Isolation and characterization of mineral phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuela region', *Soil Biol. and Biochem.*, vol. 39, pp. 2905-14.
23. Premono, ME, Moawad, AM & Vlek, PLG 1996, 'Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere', *Indonesian J. Crop Sci.*, vol. 11, pp. 13-23.
24. Puji Lestari, P, Susilowati, DN & Riyanti, EI 2007, 'Pengaruh hormon asam indolasetat yang dihasilkan *Azospirillum* sp. terhadap perkembangan akar padi', *J. Agro Biogen.*, vol. 3, no. 2, hlm. 66-72.
25. Rachmiati, Y 1995, 'Bakteri pelarut fosfat dari rizosfer tanaman dan kemampuannya dalam melarutkan fosfat', *Prosiding Kongres Nasional VI HITI*, Jakarta, 12-15 Desember.
26. Ramachandran, K, Srinivasan, V, Hamza, S & Anandaraaj, M 2007, 'Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cutting', *Pl. and Soil Sci.*, vol. 102, pp. 325-31.
27. Rao, S 1982, *Biofertilizers in agriculture*, Oxford & IBH Pub., New Delhi. pp. 100-200.
28. Ravikumar, S, Ramanathan, G, Suba, N & Jayaseeli, L 2002, 'Quantification of halophilic *Azospirillum* from mangroves', *Indian J. Mar. Sci.*, vol. 31, no. 2.
29. Savin, MC, Taylor, H, Gorres, JH & Amador, JA 2000, 'Seasonal variation in acid phosphatase activity as a function of landscape position and nutrient inputs', *Agronomy Abstract*. vol. 92, pp. 391.[terhubungberkala], accessed 27 July 2006, <[http://www.wrc.uri.edu/pubs/reports/1999/Amador\\_1999.pdf](http://www.wrc.uri.edu/pubs/reports/1999/Amador_1999.pdf)>.
30. Seshadri, S, Ignacimuthu, S & Lakshminarsimhan, C 2002, 'Variations in heterotrophic and phosphate solubilizing bacteria from Chennai, southeast coast of India', *Indian J. Mar. Sci.*, vol. 31, pp. 69-72.
31. Tabatabai, MA & Bremner, JM 1969, 'Use of p-nitrophenyl phosphate assay of soil phosphatase activity', *Soil. Biol. Biochem.*, vol. 1, pp. 301-307.
32. Tatiek, H 1991, 'Bakteri pelarut fosfat asal beberapa jenis tanah dan efeknya terhadap pertumbuhan dan hasil jagung' (*Zea mays* L.), Disertasi, Universitas Padjadjaran, Bandung.
33. Tien, TM, Gaskins, H & Hubbell, DH 1979, 'Plant growth substances produced by *Azospirillum* brasilense and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L)', *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 37, pp. 1016-24.
34. Waters, TK, Hughes II, BL, Purecell, LC, Gerhardt, KO, Mowhinney, KO & Emerich, DW 1998, 'Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 12038-042.
35. Whitelaw, MA, Harden, TJ & Heylar, KR 1999, 'Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*', *Soil Biol. and Biochem.*, vol. 31, pp. 655-65.
36. Widawati, S 2011 a, 'Diversity and phosphate solubilization by bacteria isolated from Laki island coastal ecosystem', *Biodiversitas J. Biol. Diversity*, vol. 12, no. 1, pp. 17-21.
37. Widawati, S 2011, 'The role of phosphate solubilizing bacteria and freeliving nitrogen fixing bacteria on the growth and adaptation of *Gmelina arborea* Roxb. Grown on degraded land', *J. Environ. Engineering*, vol. 7, no. 1, pp. 89-95.