

## Isolasi Bakteri Endofit Pelarut Fosfat Pada Tanaman Padi (*Oryza sativa*) var.situbagendit

### *Isolation Phosphate Solvent Endophytic Bacteria From Roots Oryza sativa var.situbagendit*

Dyah Ayu Sri Hartanti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Pertanian, Universitas KH. A. Wahab Hasbullah

Email: adyah674@yahoo.com<sup>1</sup>

#### Abstrak

Bakteri endofit adalah bakteri yang menginvasi jaringan tanaman dan mempunyai peranan terhadap pertumbuhan tanaman salah satunya adalah kemampuannya dalam pelarutan fosfat. Ketersediaan unsur fosfat sangatlah penting untuk pertumbuhan tanaman. Pada penelitian ini isolasi dan identifikasi bakteri endofit diambil dari akar tanaman padi varietas situbagendit. Dari hasil isolasi bakteri endofit tersebut didapatkan 4 jenis isolat yaitu EPS1, EPS2, EPS3, dan EPS4. Masing-masing isolat tersebut adalah genus dari *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, dan *Azotobacter*. Dalam pengukuran indeks pelarutan fosfat, isolat EPS2 merupakan isolat yang paling tinggi dalam pelarutan fosfat yaitu memiliki nilai IP sebesar 2,07.

**Kata Kunci:** Bakteri endofit, padi varietas situbagendit, isolasi, identifikasi, fosfat.

#### PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa*) adalah salah satu tanaman pertanian yang mempunyai peran penting bagi kehidupan di dunia yaitu sebagai sumber makanan pokok. Masyarakat di Desa Genreng, Kecamatan Tikung, Kabupaten Lamongan sebagian besar menggunakan bibit padi varietas situ bagendit yang mempunyai masa tanam antara 110 hingga 120 hari. Sebagian besar petani meningkatkan pertumbuhan tanaman padi dengan menggunakan pupuk sintetis. Aplikasi dan pemberian pupuk sintetis dalam jangka waktu panjang menyebabkan penurunan kesuburan tanah (Hartanti, 2020).

Bakteri di dalam tanah mempunyai peranan yang spesifik yang dapat mendukung pertumbuhan tanaman. Bakteri tersebut dikenal sebagai *Plant Growth Promotion Bacteria* (PGPB) (Tarabily *et al.*, 2003). Bakteri mampu melakukan migrasi ke dalam tanaman dan menghasilkan senyawa tertentu yang sama dengan yang dihasilkan oleh tanaman inangnya (Tarabily *et al.*, 2003). Bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman disebut sebagai bakteri endofit. Jaringan tanaman yang dapat dilakukan isolasi bakteri endofit adalah biji, akar, batang, dan daun dalam keadaan yang steril. Peranan dari bakteri endofit sangat banyak, salah satunya yaitu mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman

dengan menghasilkan atau menyediakan unsur untuk memenuhi kebutuhan tanaman, salah satu unsur yang diperlukan oleh tanaman salah satunya yaitu fosfat (Khan *et al.*, 2009).

Pada analisa suatu lahan pertanian diketahui unsur fosfat sangat tinggi, namun tidak dapat tersedia oleh tanaman, yang artinya tanaman tidak dapat menggunakan fosfat untuk kebutuhan metabolismenya, hal tersebut kemungkinan karena dipengaruhi oleh pH tanah dan juga adanya komponen berupa alumunium, besi, dan kalsium pada tanah tersebut yang mampu melakukan pengikatan unsur fosfat, sehingga fosfat tidak dapat digunakan oleh tanaman (Lal, 2002). Agar unsur hara fosfat dapat tersedia oleh tanaman, maka memerlukan bantuan mikroorganisme yaitu bakteri pelarut fosfat, salah satunya yaitu kelompok *Bacillus* dan *Pseudomonas*, sehingga penyerapan fosfat oleh tanaman dapat meningkat (Khan *et al.*, 2009). Melihat potensi bakteri endofit dalam menyediakan unsur hara fosfat untuk mendukung pertumbuhan tanaman dan pentingnya ketersediaan padi sebagai bahan makanan utama bagi masyarakat Indonesia, maka tujuan dari penelitian ini adalah melakukan isolasi bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman padi varietas situ bagendit yang mempunyai kemampuan dalam pelarutan fosfat.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, timbangan analitik, pinset, jarum ose, mikroskop, mortar, alu, *erlenmeyer glass*, pipet volume, *incubator*, penggaris, jangka sorong, cawan petri, tabung reaksi.

Bahan yang digunakan adalah akar padi varietas situbagendit yang berumur 45 hari, akuades steril, bahan kimia yaitu etanol 75%, sodium hipoklorit 5%, *Nutrient Agar* (Oxoid), *Nutrient Broth* (Oxoid), *Pikovkaya Agar* (Oxoid), kristal violet, safranin, dan iodium.

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksploratif pada tahap isolasi bakteri endofit dan uji bakteri pelarut fosfat dengan memperhatikan terbentuknya zona halo di sekitar koloni yang diinokulasikan dan menghitung indeks kelarutan (Nautiyal, 1999).

### Metode Analisis

Analisis hasil penelitian ini baik tahap isolasi dan identifikasi bakteri endofit, serta skrining bakteri yang mampu dalam pelarutan fosfat dianalisis secara deskriptif kualitatif (Nautiyal, 1999).

### Tahapan Penelitian

#### 1. Sterilisasi permukaan akar

Sterilisasi permukaan akar dilakukan dengan merendam akar sebanyak 10 gram yang sudah bersih dari kotoran ke dalam 75% etanol selama 3 menit, selanjutnya akar direndam dalam larutan sodium hipoklorit 5% selama 5 menit dan dibilas dengan air steril sebanyak lima kali (Mbai *et al.*, 2013). Cara untuk mengetahui sterilisasi akar berhasil, maka akar yang sudah disterilkan dioleskan pada media *Nutrient Agar* dan diinokulasikan pula hasil bilasan terakhir aquades pada media *Nutrient Agar*, kemudian dilakukan pengamatan hasil sterilisasi setelah 24 jam. Berhasilnya sterilisasi ditunjukkan dengan

tidak adanya bakteri ataupun kapang yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* dan juga pada akar yang telah disterilkan (Etesami *et al.*, 2014).

#### 2. Isolasi dan identifikasi bakteri endofit

Akar yang telah steril dihaluskan menggunakan mortar dan pestle, lalu akar yang telah halus dimasukkan ke dalam botol Erlenmeyer yang berisi 90 ml akuades steril. Proses pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 ml suspensi yang dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril, pengenceran dilakukan hingga  $10^{-3}$ , kemudian 1 ml suspensi hasil pengenceran diinokulasikan dengan metode tuang pada *Nutrient Agar*. Inkubasi dilakukan selama 3-5 hari di *incubator* pada suhu 28°C dalam keadaan aerob. Jumlah koloni yang tumbuh pada media dihitung dan dinyatakan dalam CFU (*Colony Forming Units*). Populasi bakteri dihitung sesuai koloni yang tumbuh pada media, penentuan jenis bakteri berdasarkan morfologi koloni bakteri. Masing-masing koloni bakteri yang terpilih diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan uji fisiologis. Dari beberapa karakteristik tersebut selanjutnya di cocokkan dengan buku panduan Bergey's manual determination. Bakteri yang didapatkan dimurnikan pada media NA dan disimpan untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Etesami *et al.*, 2014).

#### 3. Uji bakteri yang berpotensi dalam pelarutan fosfat

Kemampuan bakteri dalam pelarutan fosfat diuji pada media pikovskaya agar dengan metode *inoculation spot* dan di inkubasi selama tiga hari. Adanya zona bening disekitar koloni menunjukkan adanya pelarutan fosfat (Etesami *et al.*, 2014). Terbentuknya zona halo diamati dan dihitung indeks pelarutan fosfat (Nautiyal, 1999).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis bakteri endofit yang ditemukan dari sampel akar tanaman padi

varietas situbagendit yaitu diperoleh 4 jenis bakteri endofit yang diperlihatkan pada Tabel 1.1. Hasil pengamatan secara makroskopis maupun mikroskopis, keempat isolat bakteri ini mempunyai karakteristik yang beragam secara morfologi dan pengamatan pewarnaan Gram bakteri. Koloni beberapa isolat tersebut mempunyai bentuk *round* dan mempunyai warna krem. Tepi koloni sangat bervariasi dengan tipe

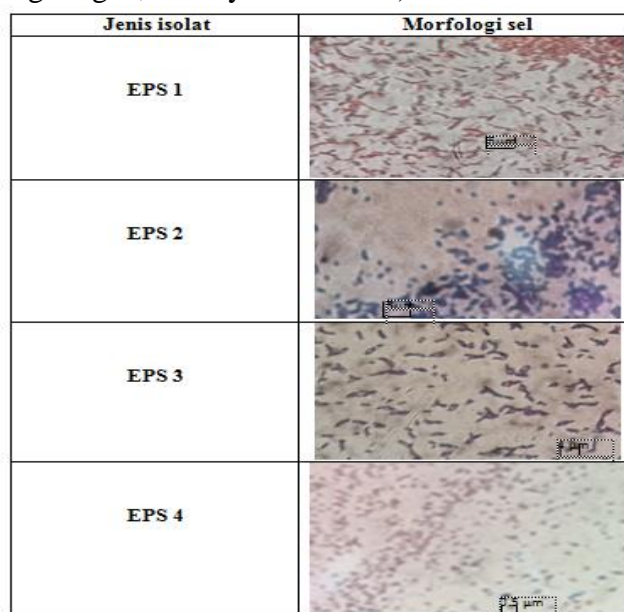
*undulate* (rata), *lobbate*, *serrat*, dan *round*. Tipe elevasi koloni bakteri pada media juga beragam dengan tipe elevasi *raised* dan *conveks* (cembung), sedangkan hasil pengamatan secara mikroskopis dengan pewarnaan gram diperoleh tiga isolat bakteri Gram negatif dan satu isolat bakteri Gram positif yang didominasi bentuk batang yang ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 1.1 Karakteristik makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri endofit dari akar tanaman padi varietas situ bagendit

Morfologi isolat	Jenis isolat			
	EPS1	EPS2	EPS3	EPS4
<b>Makroskopis koloni</b>				
Warna	Krem	Krem	Bening	Kuning
Ukuran	Kecil	Kecil	Kecil	Kecil
Bentuk koloni	Bulat	Irregular	Bulat	Bulat
Elevasi	Conveks	Conveks	Conveks	Raised
Margin	Round	Serrate	Lobate	Undulate
Permukaan	Halus	Halus	Halus	Halus
<b>Mikroskopis koloni</b>				
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Cocoid
Gram sel	Negatif	Positif	Negatif	Negatif
Motilitas	Positif	Positif	Positif	Positif
Endospora	Negatif	Positif	Negatif	Negatif

Adanya keragaman bentuk sel bakteri salah satunya karena adanya pengaruh lingkungan atau habitat dari bakteri tersebut. Selain karena faktor lingkungan, adanya

keragaman bentuk bakteri dipengaruhi oleh usia bakteri dan faktor nutrisi yang diperlukan untuk regenerasi bakteri (Ilyas, 2001).



Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri endofit dari akar tanaman padi varietas situ bagendit

Berdasarkan perbedaan karakteristik makroskopis dan mikroskopis masing-masing isolat diatas, selanjutnya dilakukan uji fisiologis dan kemudian dilakukan proses identifikasi. Bakteri yang tumbuh pada suatu media, dapat ditentukan jenisnya dengan cara mengamati perubahan warna media tumbuhnya, hal tersebut dikarenakan setiap jenis bakteri mampu menghasilkan hasil metabolitnya atau menggunakan media untuk kepentingan metabolismenya sehingga dapat mempengaruhi warna pada mediana (Ilyas, 2001). Metode identifikasi isolat bakteri pada penelitian ini

menggunakan teknik konvensional. Metode tersebut dilakukan dengan cara melakukan perbandingan bakteri yang berhasil ditemukan dengan bakteri yang sudah ditemukan sebelumnya dan berhasil teridentifikasi. Apabila proses identifikasi tidak ada kesamaan 100% dengan bakteri yang telah ada sebelumnya, maka dapat dilakukan pendekatan yang paling sesuai kesamaannya. Pengamatan secara fisiologis masing-masing isolat yang diperoleh dari akar padi varietas situbagendit disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1.2. Karakteristik fisiologis hasil uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*), SCA (*Simmon Citrate Agar*), motilitas, katalase

Nama Isolat	Uji TSIA				MR	VP	Uji Motilitas		Uji Ktls	Uji St
	Slant	Butt	Gas	H <sub>2</sub> S			Motil	Indol		
EPS 1	Merah	Kuning	-	-	-	+	+	+	+	+
EPS 2	Merah	Kuning	-	-	+	-	+	+	+	+
EPS 3	Merah	Kuning	-	-	-	+	+	+	+	+
EPS 4	Merah	Kuning	+	-	+	+	+	+	+	+

Berdasarkan karakteristik yang didapatkan secara mikroskopis, makroskopis, dan fisiologis, maka dapat dilakukan proses identifikasi dengan menggunakan buku panduan *Bergey's manual determination* untuk mengetahui jenis genus dari keempat isolat yang berhasil diisolasi. Dari keempat isolat tersebut masing-masing yaitu EPS1 adalah genus dari *Pseudomonas*, isolat EPS2 adalah genus dari *Bacillus*, isolat EPS3 adalah genus *Enterobacter*, isolat EPS4 adalah salah satu spesies dari genus *Azotobacter*.

Kelimpahan populasi bakteri rhizosfer lebih banyak jika dibandingkan dengan bakteri yang masuk ke dalam jaringan tanaman, hal ini dipengaruhi oleh faktor internal atau dari bakteri itu sendiri maupun faktor eksternal atau faktor lingkungan yang dapat berupa faktor abiotik (Roesc *et al.*, 2006). Faktor yang berasal dari bakteri itu sendiri maupun dari tanaman yang menjadi kolonisasi bakteri yaitu struktur morfologi

dan anatomi tanaman, jenis bakteri, umur tanaman, dan enzim yang mampu dikeluarkan oleh bakteri tersebut (Altalhi, 2009). Faktor abiotik yang berperan yaitu salah satunya penggunaan pupuk sintetis yang sangat tinggi yang dapat mempengaruhi keberadaan bakteri tanah dan mengganggu kemampuan bakteri endofit dalam melakukan migrasi kedalam jaringan tanaman.

Jaringan tanaman yang berhasil di invasi oleh bakteri menunjukkan kecocokan satu sama lain atau bersifat sinergis, demikian pula dengan bakteri endofit yang berhasil ditemukan pada akar tanaman padi varietas situbagendit yang terdiri spesies *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, dan *Azotobacter*. Bakteri yang berhasil diisolasi merupakan bakteri yang secara umum berada pada daerah rhizosfer yang diketahui mampu melakukan peningkatan pada proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Proses terjadinya

kolonisasi karena adanya komunikasi yang dilakukan oleh bakteri dengan tanaman melalui sinyal molekuler yang ada (Long *et al.*, 2008, Rosenblueth dan Romero, 2006). Melalui mekanisme sinyal yang ada memungkinkan bakteri memberikan respon penyesuaian diri populasi terhadap tanaman inang, seperti peningkatan kepadatan populasi sel bakteri, sehingga *quorum sensing* adalah pemicu respon fisiologi yang

membantu untuk konservasi energi, produksi antibiotik, maupun exoenzym oleh bakteri bagi tanaman inang (Hudson *et al.*, 2010).

Hasil pengukuran indeks pelarutan fosfat yang ditunjukkan pada tabel 1.3 diperoleh isolat EPS2 tertinggi dalam kemampuan pelarutan fosfat dengan nilai IP (*solubilization index*) sebesar 2,07.

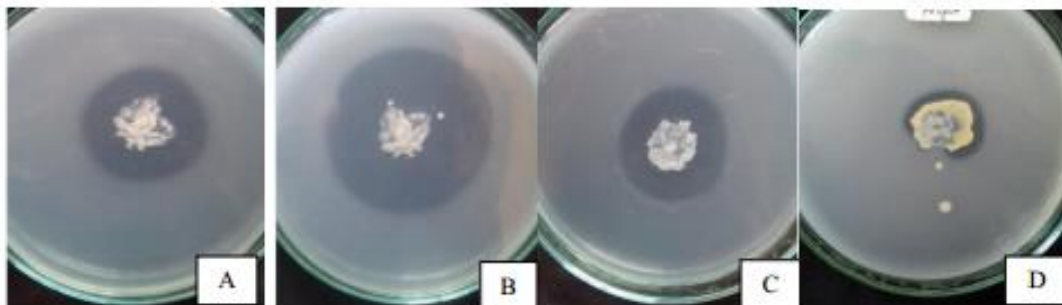
Tabel 1.3 Nilai kemampuan pelarutan fosfat oleh bakteri endofit varietas situ bagendit

Jenis isolat	Diameter koloni (cm)	Diameter zona halo (cm)	Solubilization index
EPS1	1.2	3.5	1.91
EPS2	1.3	4.0	2.07
EPS3	1.3	1.6	0.23
EPS4	1.2	3.4	1.83

Fosfat yang tersedia di alam dapat berupa fosfat organik dan fosfat anorganik. Tersedianya fosfat organik berasal dari komponen makhluk hidup yaitu misalnya tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme yang berupa fosfolipid dan fitin (Rao, 1994). Pelarutan fosfat secara biologis terjadi ketika mikroba menghasilkan enzim fosfatase dan enzim fitase (Alexander, 1977). Fosfatase merupakan enzim yang akan dihasilkan apabila ketersediaan fosfat rendah. Fosfatase dieksresikan oleh akar tanaman dan mikroba sehingga mampu membebaskan ion fosfat terikat dan oleh karena itu dapat fosfat dapat diserap oleh tanaman (Alexander, 1977). Kemampuan genus *Bacillus* dan *Pseudomonas* dalam

melakukan pelarutan fosfat karena mampu menghasilkan asam organik yaitu sebagai contoh asam formiat, asetat dan lasam aktat. Asam organik tersebut mampu melarutkan fosfat, sehingga membuat fosfat yang tidak tersedia menjadi fosfat yang tersedia bagi tanaman, sehingga mikroorganisme tanah yang berperan dalam pelarutan fosfat mempunyai peran penting untuk menanggulangi defisiensi fosfat pada tanaman (Kang *et al.*, 2007; Chaiharn *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Mehrab *et al.*, 2010).

Terbentuknya zona halo pada media pikovkaya agar karena adanya pelarutan suspensi trikalsium fosfat oleh bakteri yang mampu melarutkan trikalsium fosfat tersebut (Alam *et al.*, 2002) (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil positif bakteri mampu melakukan pelarutan fosfat dengan adanya zona halo yang terbentuk. Ket. A= isolat EPS1; B= isolat EPS2 ; C= isolat EPS3 ; D= isolat EPS4

## KESIMPULAN

Terdapat 4 jenis bakteri endofit pada tanaman padi (*Oryza sativa*) varietas situbagendit yaitu isolat EPS1 adalah genus *Pseudomonas*, isolat EPS2 adalah genus *Bacillus*, isolat EPS3 adalah genus *Enterobacter*, dan isolat EPS4 adalah genus *Azotobacter*. Keempat isolat bakteri endofit yang ditemukan mampu dalam pelarutan fosfat dan isolat EPS2 dari genus *Bacillus* mempunyai pelarutan fosfat tertinggi yaitu memiliki nilai IP sebesar 2,07.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., dan Rashid, M. 2002. *In vitro Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere*. International Journal of Agriculture & Biology, Vol. 4, No. 4, h. 454-458.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology. 2nd Edition*. New York: John Wiley and Sons.
- Altalhi, A.D. 2009. *Plasmid Profiler, Antibiotic and Heavy Metal Resistance Incidence of endophytic bacteria isolated from Grampevine (Vitis vinifera L.)*. African Journal of Biotechnology. Vol. 8, No. 21, h. 5873-5882.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchan, S., Kozo, A., Lumyong, S. 2008. *Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities*. KMITL Sci. Tech. J, Vol. 8, No. 1, h. 18-23.
- Hartanti, Dyah. A. 2020. *Biofertilizer Terhadap Kesuburan Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. UNWAHA press.
- Etesami, H., Mirsyed, Hosseini, H., Alikhani, H.A., Mohammadi, L. 2014. *Bacterial biosynthesis of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) deaminase and Indole-3-Acetic Acid (IAA) as endophytic preferential selection traits by rice plant seedlings*. J. Plant. Growth. Regul, h. 1-17.
- Hudson, A.O., Ahmad, N.H., Buren, R. Van, dan Savka, M.A. 2010. *Sugarcane and Grapevine Endophytic Bacteria: Isolation, Detection of Quorum Sensing Signals and Identification by 16S v3 rDNA Sequence Analysis*. Technology and Education Topics. Applies Microbiology and Microbial Biotechnology, h. 801-806.
- Ilyas, S. 2001. *Mikrobiologi Dasar*. Medan: Universitas Sumatera Utara press.
- Kang, S.H., Cho, H.S., Cheong, H., Ryu, C.M., Kim, J.F., Park, S.H. 2007. *Two bacterial entophytes eliciting plant growth promotion and plant defense on pepper (Capsicum annum L.)*, J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 27, h. 96-103.
- Khan, A. Jilani A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., dan Rasheed, M. 2009. *Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production*. Journal Agriculture Biol. Sci., Vol. 1, h. 48-58.
- Lal, L. 2002. *Phosphate Biofertilizer*. India: Agrotech. Publ. Academy.
- Long, H. H., Schmidt, D. D., dan Baldwin, I. T. 2008. *Native Bacterial Endophytes Promote Host Growth in a Species-Specific Manner; Phytohormone Manipulations Do Not Result in Common Growth Responses*.
- Mbai, F.N., Magiri, E.N., Matiru, V.N., Ng'ang'a, J., Nyambati, V.C.S. 2013. *Isolation and Characterisation of Bacterial Root Endophytes with Potential to Enhance Plant Growth from Kenyan Basmati Rice*, American International Journal of Contemporary Research, Vol. 3, No.4.
- Nautiyal, C.S., 1999. *An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms*. FEMS Microbiol. Lett., Vol. 170, h. 265-270.
- Rao, N.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman Edisi Kedua*. Jakarta: UI-Press.
- Roesch, L.F.W., Olivares, F.L., Passaglia, L.M.P., Selbach, P.A., de Sá, E.L.S., de Camargo, F.A.O. 2006.

- Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply.* World J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 22, h. 967–974.
- Rosenblueth, M dan Martínez-Romero, E. 2006. *The American Phytopathological Society.* MPMI, Vol. 19, No. 8, h. 827–837.
- Tarabily, K., Nassar, A. H., dan Sivasithamparam, K. 2003. *Promotion Of Plant Growth By An Auxin- Producing Isolate Of The Yeast Williopsis Saturnus Endophytic In Maize Roots.* The Sixth U. A. E University Research Conference. h. 60- 69.