

Kemampuan Konsorsium *Bacillus* pada Pupuk Hayati dalam Memfiksasi N₂, Melarutkan Fosfat dan Mensintesis Fitohormon *Indole-3-Acetic-Acid*

The Ability of Bacillus Consortium to Fix N₂, Solubilize Phosphate and Synthesize Indole-3-Acetic Acid Fitohormone

Muhimatul Husna¹, Sugiyanta², Etty Pratiwi³

¹Jurusan Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

³Balai Penelitian Tanah, Jl. Tentara Pelajar No.12 Cimanggu, Bogor 16114, Indonesia

INFORMASI ARTIKEL

Riwayat artikel:

Diterima: 11 Mei 2019

Direview: 13 Mei 2019

Disetujui: 04 Juli 2019

Kata kunci:

Asam organik

Fiksasi N₂

IAA

Konsorsium *Bacillus*

Pupuk hayati

Keywords:

Organic acid

N₂ Fixation

IAA

Bacillus consortium

Biofertilizer

Direview oleh:

Edi Husen, Antonius Kasno

Abstrak. Bakteri *Bacillus* sp. non patogenik memiliki potensi sebagai pupuk hayati. Pupuk hayati di Indonesia sebagian besar terdiri atas konsorsium beberapa macam mikroba. Pupuk hayati yang diuji, "Pupuk X" terdiri atas 10 spesies bakteri *Bacillus* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas Pupuk X dalam melarutkan fosfat, memfiksasi N₂ dan mensintesis fitohormon *Indole-3-Acetic Acid* (IAA), serta mengujinya secara *in planta* pada bibit padi. Kemampuan melarutkan fosfat diuji pada media Pikovskaya padat dengan mengamati munculnya zona bening di sekeliling koloni. Kemampuan memfiksasi N₂ secara kualitatif dan kuantitatif masing-masing diuji pada media NFB padat dan *Acetylene Reduction Assay*. Kemampuan sintesis IAA diukur secara kolorimetri pada λ 530 nm, sedangkan pengaruh pupuk hayati cair terhadap bibit tanaman padi diuji secara *in planta* menggunakan bibit padi varietas IPB3S. Sedikitnya terdapat enam spesies bakteri *Bacillus* pada pupuk hayati yang digunakan memperlihatkan morfologi koloni berbeda, dengan total populasi mencapai $7,6 \times 10^{11}$ cfu ml⁻¹ dan ukuran sel-sel *Bacillus* sp. bervariasi antara 2,39-3,01 μ m. Pada pupuk hayati ini terdeteksi aktivitas nitrogenase sebesar 0,05685 μ m ml⁻¹ jam⁻¹. Konsorsium *Bacillus* ini dapat melarutkan fosfat dari sumber Ca₃(PO₄)₂ dengan indeks pelarut fosfat 2,6. Fosfat terlarut tersebut disebabkan karena produksi empat jenis asam organik oleh *Bacillus* sp., yaitu asam asetat, asam oksalat, asam laktat, dan asam malat dengan konsentrasi sekitar 0,01-1,02 mg l⁻¹. Konsentrasi IAA pada pupuk hayati cair terdeteksi sebesar 3,0065 μ g ml⁻¹. Inokulasi Pupuk X pada bibit padi dapat meningkatkan jumlah akar lateral 42,8% yang berpotensi meningkatkan serapan hara dalam tanah.

Abstract. Non-pathogenic *Bacillus* sp. has the potential as a biofertilizer. Biofertilizers in Indonesia mostly consist of a consortium of several kinds of microbes. Liquid biofertilizer, "Biofertilizer X" is a compound fertilizer consists of ten species of *Bacillus* sp. This research was aimed at evaluating the ability of the *Bacillus* consortium in Biofertilizer X to dissolve phosphate, fix N₂ and synthesize Indole-3-Acetic Acid (IAA) phytohormone, as well as its effect on rice seedling. The ability to dissolve phosphate was tested on solid Pikovskaya media by observing the appearance of a clear zone around the bacterial colony. The ability to fix N₂ qualitatively and quantitatively was tested on solid NFB media and Acetylene Reduction Assay, respectively. The ability of IAA synthesis was measured by colorimetry at λ 530 nm, while the effect of liquid biofertilizers on rice seedlings was tested in planta using IPB3S variety rice seedling. There were at least six species of *Bacillus* in liquid biofertilizers showing different colony morphologies. The total population reached 7.6×10^{11} cfu ml⁻¹ and the size of *Bacillus* sp. varied between 2.39-3.01 μ m. Nitrogenase activity of this biofertilizer was detected at 0.05685 μ m ml⁻¹ h⁻¹. This *Bacillus* consortium solubilized phosphate from Ca₃(PO₄)₂ source with solubilizing index of 2.6. This solubilization was attributable to the the production of four types of organic acids by *Bacillus* sp., namely acetic acid, oxalic acid, lactic acid, and malic acid with concentrations of 0.01-1.02 mg mg l⁻¹. IAA concentrations in this biofertilizers were detected at 3.0065 μ g ml⁻¹. Inoculation of this biofertilizers increased the number of lateral roots of rice seedlings by 42.8% and these lateral roots have the potential to increase nutrient uptake in the soil.

Pendahuluan

Pupuk hayati adalah inokulan berbahan aktif organisme hidup yang berfungsi untuk menambat hara tertentu atau memfasilitasi tersedianya hara dalam tanah bagi tanaman (Simanungkalit *et al.* 2006). Berdasarkan

komposisi mikroba, pupuk hayati terdiri dari mikroba tunggal dan majemuk. Menurut Fredrickson (2015) beragam spesies mikroba yang terkandung dalam pupuk hayati dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi mikroba dalam meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Beberapa kemampuan yang dimiliki oleh

* Corresponding author: mr_sugiyanta@yahoo.co.id

mikroba dalam pupuk hayati adalah memfiksasi N_2 , melarutkan fosfat dalam tanah, memproduksi berbagai fitohormon serta metabolit sekunder antipatogen.

Bakteri *Bacillus* sp. dapat meningkatkan ketersediaan nitrogen dengan memfiksasi N_2 di atmosfer (Mrkovacki *et al.* 2016). Kumar dan Rai (2017) menyatakan bahwa *Bacillus* sp. merupakan salah satu spesies bakteri pelarut fosfat. Salah satu spesies *Bacillus* yang dapat meningkatkan ketersediaan unsur hara nitrogen dan fosfat dalam tanah adalah *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* dan *B. pumilus* (Borriss 2015). Selain dapat meningkatkan ketersediaan hara dalam tanah, *Bacillus* sp. dapat mensintesis fitohormon auksin berupa *Indole 3-Acetic Acid* (IAA) yang berfungsi meningkatkan pertumbuhan akar dan tunas tanaman (Aroujo *et al.* 2012; Vejan *et al.* 2016). Fitohormon IAA mempengaruhi proses perkembangan tanaman karena IAA endogen pada tanaman dapat diubah oleh IAA yang telah disekresikan oleh mikroba tanah sehingga produksi IAA tanaman menjadi lebih banyak (Spaepen *et al.* 2007; Glick 2012).

Pupuk hayati di Indonesia sebagian besar merupakan pupuk hayati majemuk yang terdiri atas konsorsium beberapa macam mikroba. Pada penelitian ini digunakan pupuk hayati cair yaitu "Pupuk X" yang merupakan konsorsium 10 spesies bakteri *Bacillus* sp. (*Bacillus catenulatus*, *B. cereus*, *B. drentensis*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. megaterium*, *B. niacini*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*, dan *B. thuringiensis*).

Penelitian bertujuan mengevaluasi kemampuan konsorsium *Bacillus* pada Pupuk X dalam melarutkan fosfat, memfiksasi N_2 dan mensintesis fitohormon *Indole-3-Acetic Acid* (IAA), serta mengujinya secara *in planta* pada bibit padi varietas IPB3S.

Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan pada bulan September 2018 sampai Desember 2018 di Laboratorium Biologi Tanah Balai Penelitian Tanah, Cimanggu Bogor dan di Laboratorium Kultur Jaringan 3 Departemen Agonomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian IPB.

Uji Populasi dan Karakterisasi Konsorsium *Bacillus*

Isolat konsorsium *Bacillus* diambil dari pupuk hayati cair. Sebanyak 100 μ l sampel pupuk hayati yang telah diencerkan dengan larutan garam fisiologi disebar pada media *Nutrient Agar* (NA) padat dengan komposisi: *beef extract powder* 3 g l^{-1} , pepton 5 g l^{-1} dan agar 20 g l^{-1} (Beever and Bollard 1970). Pengenceran dilakukan pada level 10^{-6} - 10^{-10} . Bakteri yang telah tumbuh pada media NA tersebut dikarakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan

mengamati morfologi koloni yang mencakup bentuk, tepian dan elevasi serta warna koloni bakteri. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati ukuran sel menggunakan mikroskop. Uji pewarnaan Gram pada kultur yang tumbuh di medium NA dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang teridentifikasi merupakan bakteri Gram positif (*Bacillus* termasuk Gram positif).

Uji Patogenisitas Konsorsium *Bacillus*

Uji patogenisitas tanaman dilakukan menggunakan daun tembakau. Sebanyak 1 ml pupuk hayati yang telah diencerkan pada level 10^{-2} disuntikkan pada daun tembakau. Sebagai kontrol positif digunakan bakteri patogen sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades steril. Reaksi patogenisitas pada tanaman ditandai dengan adanya gejala nekrotik yang muncul pada jaringan daun dan diamati pada hari kedua setelah penyuntikan berdasarkan prosedur Zou *et al.* (2006). Uji patogenisitas pada mamalia diuji menggunakan media *Agar Darah* (*Blood Agar*). Konsorsium *Bacillus* setelah diencerkan 10^{-2} ditetaskan pada *Blood Agar* sebanyak 2-3 μ l. Bakteri *E.coli* patogenik digunakan sebagai uji kontrol positif.

Uji Kemampuan Fiksasi N_2 secara Kualitatif dan Kuantitatif

Kemampuan bakteri memfiksasi N_2 secara kualitatif diamati pada media padat bebas nitrogen, yakni *Nitrogen free Bromothymol blue malate* (NFB) (Abdallah *et al.* 2018). Setiap liter media NFB mengandung: *malic acid* 5 g, KOH 4 g, K_2HPO_4 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g, NaCl 0,02 g, CaCl 0,01 g, Na_2MoO_4 0,002 g, *Bromothymol Blue* 0,5% dan agar 2% dengan pH media berkisar antara 6,6 - 7,0 (Dobereiner *et al.* 1976). Kultur diinkubasi selama 6 hari pada suhu ruang.

Sedangkan kemampuan memfiksasi N_2 secara kuantitatif diukur dengan mengamati aktivitas nitrogenase menggunakan *Acetylene Reduction Assay* (ARA) sesuai metode yang dikembangkan oleh Hardy *et al.* (1968). Etilen yang terbentuk pada kromatografi gas merupakan hasil dari aktivitas enzim nitrogenase yang dihasilkan oleh bakteri uji. Sebanyak 100 μ l sampel pupuk hayati hasil pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} dikultivasi dalam tabung ukuran 25 ml berisi 10 ml media NFB semi padat kemudian divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Kultur sel dipanen setelah terjadi perubahan kekeruhan pada media. Sebagai kontrol diberikan media NFB yang tidak diinokulasikan dengan bakteri. Pada saat akan dilakukan pengukuran kadar etilen, tutup tabung kultur yang semula kapas diganti dengan *rubber stopper*. Udara di dalam tabung diambil menggunakan *microsyringe* sebanyak 10% dan diganti dengan gas asetilen kemudian diinkubasi selama 1,5 jam.

Uji Kemampuan Konsorsium *Bacillus* Melarutkan Fosfat

Pengujian kemampuan konsorsium *Bacillus* dalam melarutkan fosfat dilakukan menggunakan media Pikovskaya padat. Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni mengindikasikan bakteri mampu melarutkan fosfat. Bakteri ditumbuhkan pada media Pikovskaya padat yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Setiap liter medium Pikovskaya padat mengandung glukosa 10 g, NaCl 0,04 g, Ca₃(PO₄)₂ 5 g, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g, KCl 0,2 g, MgSO₄·7H₂O 0,1 g, FeSO₄·7H₂O 2,5 mg, MnSO₄·7H₂O 2,5 mg, yeast extract 0,5 g dan agar 15 g (Sundara Rao dan Sinha 1963). Indeks Pelarutan (IP) fosfat diukur dengan membandingkan diameter zona bening terhadap diameter koloni.

Jenis dan total asam organik yang mempengaruhi kemampuan melarutkan fosfat diidentifikasi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* sesuai dengan metode Baziramakenga *et al.* (1995).

Uji Kemampuan Produksi Fitohormon IAA

Konsorsium *Bacillus* diinokulasi dalam media cair *Tryptone Soya Broth* (TSB) dengan komposisi per liter media terdiri atas *pancreatic digest of casein* 17 g, *enzymatic digest of soya peptone* 3 g, K₂HPO₄ 2,5 g, NaCl 5 g dan glukosa 2,5 g (MacFaddin 1986) dan diinkubasi selama 3 hari. Sebanyak 2 ml suspensi kultur dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 2 ml, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Metode yang digunakan untuk memperoleh nilai IAA adalah metode Gordon dan Weber (1951). Sebanyak 1,75 ml supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi Salkowski dengan volume yang sama kemudian diinkubasi selama 60 menit dan diukur absorbansinya spektrofotometer pada $\lambda = 530$ nm.

Uji in Planta

Sterilisasi permukaan benih padi menggunakan 1% NaOCl steril kemudian benih dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan perendaman dengan pupuk hayati yang telah diencerkan (30x, 50x, 100x, 200x, 300x) dan tanpa pupuk hayati sebagai kontrol. Benih ditempatkan di atas kertas saring steril di dalam Petridish selama 24 jam sampai muncul radikula. Bibit padi kemudian ditempatkan di kantong tumbuh steril yang berisi larutan hara Jensen bebas nitrogen. Setiap liter media Jensen mengandung sukrosa 20 g, Na₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, NaCl 0,5 g, FeSO₄·7H₂O 0,1 g, Na₂MoO₄ 0,005 g dan CaCO₃ 2 g (Jensen 1942). Pengamatan akar padi diamati secara periodik setiap 2 hari sampai bibit padi berumur 2 minggu. Panjang dan banyak akar bibit padi diukur dan dibandingkan dengan kontrol.

Hasil dan Pembahasan

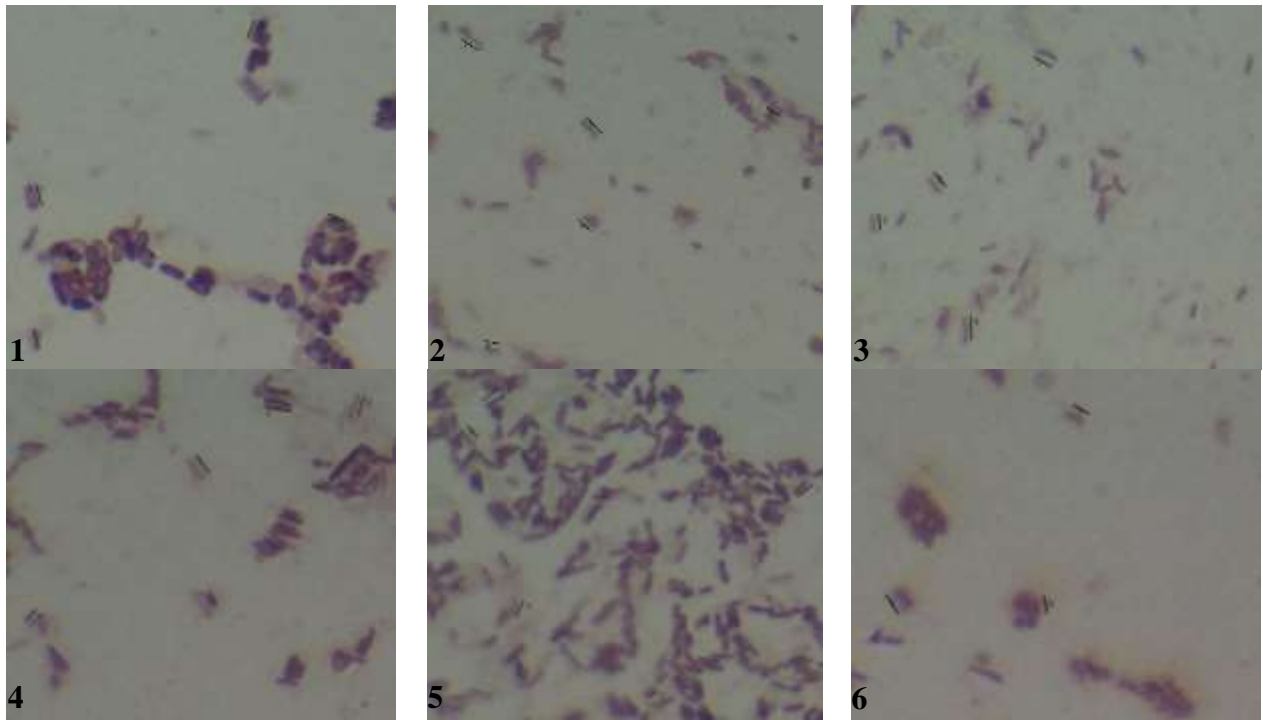
Populasi dan Karakterisasi Konsorsium *Bacillus*

Setelah diinkubasi selama 3 hari, diketahui rata-rata populasi konsorsium *Bacillus* adalah $7,6 \times 10^{11}$ cfu ml⁻¹. Jumlah populasi mikroba ini telah memenuhi batas populasi minimal dalam pupuk hayati sesuai persyaratan Permentan No. 70 tahun 2011. Dari hasil pengamatan morfologi koloni hanya ditemukan 6 isolat *Bacillus* yang memperlihatkan karakter morfologi yang berbeda dalam bentuk, warna, tepian dan elevasi koloni (Gambar 1). Koloni isolat *Bacillus* yang tumbuh pada media nutrient agar pada umumnya berbentuk bulat, tepian licin, elevasi timbul dan warna koloni putih hingga kecoklatan. Perbedaan morfologi koloni 6 isolat *Bacillus* terdapat pada Tabel 1.



Gambar 1. Jenis mikroba dari pupuk hayati cair yang ditumbuhkan pada medium NA

Figure 1. *The population of Bacillus sp. consortium grown on NA medium*



Gambar 2. Pewarnaan Gram isolat 6 spesies *Bacillus*
 Figure 2. Gram staining of 6 species of *Bacillus* isolates

Tabel 1. Ukuran panjang sel dan morfologi mikroskopis dan makroskopis koloni 6 spesies *Bacillus* perbesaran 10×10

Table 1. Cell length, microscopic and macroscopic morphology of 6 species of *Bacillus* with magnification 10×10

<i>Bacillus</i>	Ukuran sel (μm)	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna
1	2,603	Bulat	Licin	Timbul	Putih susu
2	2,945	Bulat di tengah keriput	Berombak	Timbul	Agak coklat
3	2,455	Bulat	Licin	Cembung	Putih keruh
4	3,010	Bulat	Licin	Cembung	bening
5	2,692	Bulat	Seperti wol	Timbul	Putih susu
6	2,392	Bulat	Licin	Timbul	Coklat bening

Masing-masing koloni *Bacillus* memiliki bentuk dan struktur berbeda karena pertumbuhan koloni dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan karakter masing-masing spesies maupun strain yang spesifik (Schindler 1993). Pewarnaan Gram terhadap 6 spesies *Bacillus* yang terdeteksi dilakukan untuk meyakinkan bahwa seluruh spesies tersebut adalah *Bacillus*. Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa semua bakteri uji merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk basil (Gambar 2). Secara mikroskopis masing-masing bakteri memiliki ukuran panjang sel yang berbeda-beda mulai dari 2,39 sampai 3,01 μm (Tabel 1). Menurut Zeigler dan Perkins (2008) panjang sel *B. subtilis* berukuran 2,0 - 3,0 μm sedangkan kelompok *B. cereus* 3,0 - 5,0 μm .

Patogenisitas Konsorsium *Bacillus*

Hasil uji patogenisitas konsorsium *Bacillus* pada daun tembakau menunjukkan bahwa *Bacillus* tidak bersifat patogenik pada tanaman. Hal ini ditandai dengan tidak terdapatnya nekrosis pada daun tembakau yang diinokulasi (Gambar 3.2). Tidak ditemukannya nekrosis pada daun juga terdapat pada kontrol negatif menggunakan akuades steril sedangkan pada kontrol positif terdapat nekrosis pada daun.

Pengujian patogenisitas konsorsium *Bacillus* pada *Blood Agar* menunjukkan bahwa *Bacillus* tidak melisis darah mamalia (Gambar 3.3). Artinya konsorsium *Bacillus* pada pupuk hayati ini aman bagi petani pada saat mengaplikasikan pupuk hayati ke tanaman.



Gambar 3. Uji patogenisitas pada daun tembakau 1) kontrol positif patogen dan 2) konsorsium *Bacillus*; 3) Uji patogenisitas pada agar darah

Figure 3. Pathogenicity test on tobacco leaves 1) positive control of pathogens; 2) *Bacillus* consortium and 3) pathogenicity test on blood agar

Kemampuan Fiksasi N₂ secara Kualitatif dan Kuantitatif

Konsorsium *Bacillus* dapat tumbuh di media NFB setelah diinkubasi selama 6 hari, hal ini menunjukkan bahwa beberapa spesies dari konsorsium *Bacillus* yang berasal dari pupuk hayati dapat memfiksasi N₂. Populasi *Bacillus* sp. yang tumbuh pada media NFB adalah sebanyak $1,49 \times 10^5$ cfu ml⁻¹ (Gambar 4). Bakteri *Bacillus* termasuk bakteri hidup bebas yang dapat memfiksasi N₂ (Hopkins dan Dungait 2010). Menurut Rascio dan Rocca (2013) *Bacillus* merupakan bakteri diazotropik endofit yang dapat masuk ke dalam jaringan tanaman. Pada umumnya bakteri ini terbatas pada ruang antar sel terutama ke pembuluh xilem di mana tekanan O₂ rendah dan laju respirasi bakteri yang tinggi akan membentuk kondisi mikroaerob yang dibutuhkan untuk aktivitas nitrogenase. Nitrogenase adalah enzim kompleks yang digunakan oleh bakteri dalam memfiksasi N₂ dengan mengubah nitrogen menjadi NH₃ (Olanrewaju *et al.* 2017).

Uji kemampuan konsorsium bakteri *Bacillus* dalam memfiksasi N₂ melalui aktivitas enzim nitrogenase menggunakan metode ARA yaitu identifikasi perubahan gas asetilen (C₂H₂) menjadi etilen (C₂H₄). Konsorsium bakteri *Bacillus* diisolasi pada media NFB semi padat dan diinkubasi selama 6 hari pada suhu ruang. Pertumbuhan konsorsium *Bacillus* membentuk pelikel berwarna putih di area permukaan media Konsorsium *Bacillus* yang tumbuh pada media NFB semi padat kemudian dianalisis kemampuan memfiksasi N₂ menggunakan kromatografi gas. Nilai koefisien kurva standar gas etilen adalah $R^2 = 0,86$. Hasil uji 6 ulangan konsorsium *Bacillus* dengan metode ARA menunjukkan bahwa konsorsium *Bacillus* menghasilkan enzim nitrogenase dengan mereduksi gas asetilen menjadi etilen. Berdasarkan hasil perhitungan produksi nitrogenase, konsorsium *Bacillus* dapat

memfiksasi N₂ dengan rata-rata $0,05685 \mu\text{m ml}^{-1} \text{jam}^{-1}$ (Tabel 2). Proses fiksasi N₂ di atmosfer berkontribusi dalam kuantitas ketersediaan nitrogen dalam tanah. Fiksasi nitrogen merupakan proses perubahan energi yang cukup besar dengan melibatkan enzim nitrogenase sebagai katalisatornya (Bruijn 2015; Olanrewaju *et al.* 2017). Kemampuan produksi enzim setiap spesies *Bacillus* berbeda-beda. Hasil penelitian Arashida *et al.* (2018) konsorsium *Rhodopseudomonas palustris* dan *B. subtilis* mampu menghasilkan nitrogenase $8,16 \mu\text{m ml}^{-1} \text{jam}^{-1}$ namun tidak terdeteksi pada *B. subtilis* secara tunggal.



Gambar 4. Konsorsium *Bacillus* tumbuh pada media NFB

Figure 4. *Bacillus* sp. consortium on NFB media

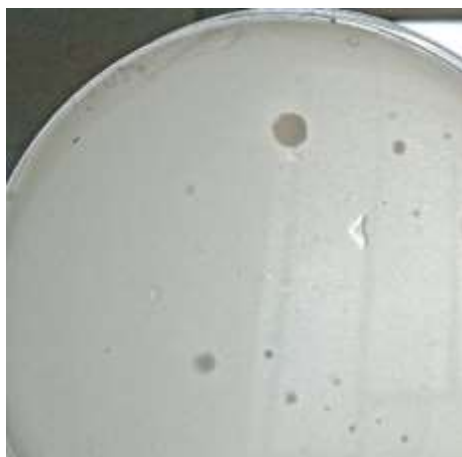
Kemampuan Konsorsium *Bacillus* Melarutkan Fosfat

Kemampuan konsorsium *Bacillus* melarutkan fosfat secara kualitatif dilihat dari kemampuan melarutkan unsur fosfat dari Ca₃(PO₄)₂ sebagai sumber fosfat yang terikat pada media Pikovskaya. Setelah diinkubasi selama 7 hari

Tabel 2. Kemampuan fiksasi nitrogen dan analisis pengukuran IAA konsorsium *Bacillus*

Table 2. *N₂ fixation N capability and analysis of IAA Bacillus consortium*

Ulangan	Aktivitas nitrogenase ($\mu\text{m ml}^{-1} \text{jam}^{-1}$)	IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0,0570	2,2289
2	0,0564	2,5760
3	0,0563	3,7070
4	0,0568	3,7360
5	0,0563	2,6927
6	0,0583	3,0985
Rata-rata	0,0568	3,0065



Gambar 5. Zona bening *Bacillus* melarutkan fosfat

Figure 5. Clear zone phosphate solubilizing *Bacillus*

pada suhu ruang 30°C diperoleh satu isolat *Bacillus* yang dapat melarutkan fosfat pada media Pikovskaya dengan nilai indeks kelarutan fosfat 2,6. Isolat tersebut melarutkan fosfat, dengan zona bening berdiameter 8 mm (Gambar 5). Pada penelitian Jarak *et al.* (2012) *Bacillus* sp. Q5a dapat melarutkan fosfat dengan diameter zona bening 10,67 mm.

Terdapat dua sumber fosfat dalam tanah yaitu, mineral anorganik dan fosfat organik. Proses pelarutan fosfat dari mineral anorganik dipengaruhi oleh asam organik yang dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat. Jenis dan konsentrasi asam organik menentukan besar kapasitas pelarut fosfat dari mineral anorganik. Pada penelitian ini konsorsium *Bacillus* memproduksi empat jenis asam organik, yaitu asam asetat, asam oksalat, asam laktat dan asam malat (Tabel 3). Asam laktat memiliki konsentrasi paling tinggi yaitu 1,02 mg l⁻¹. Tampaknya terdapat perbedaan konsentrasi asam organik pada spesies *Bacillus* sp. yang berbeda. Hasil penelitian Setiawati *et al.* (2014) diperoleh

hasil bahwa pada bakteri *B. mycoides* dihasilkan lima jenis asam organik yaitu asam tartarat, asam malat, asam sukinat, asam laktat dan asam asetat, dengan produksi asam organik paling banyak adalah asam laktat dan asam tartarat sebanyak 1,6 mg l⁻¹.

Asam-asam organik ini dilepaskan oleh bakteri kemudian bereaksi dengan Ca₃(PO₄)₂ dan membentuk kelat (kompleks stabil) dengan kation pengikat P (Ca⁴⁺) disertai dengan terlepasnya HPO₄ (Kumar dan Saraf 2015). Menurut Bianco dan Defez (2010) asam organik memblokir bagian penyerapan atau pengikatan fosfat pada partikel tanah. Mineralisasi fosfat organik dalam tanah hingga membentuk P tersedia bagi tanaman (H₂PO₄⁻ atau HPO₄⁻²) sangat tergantung pada reaksi biokimia tanah terkait dengan keberadaan fosfatase yang dihasilkan oleh bakteri (Salam 2014).

Tabel 3. Jenis dan konsentrasi asam organik konsorsium *Bacillus*

Table 3. *Types and concentration of organic acids Bacillus consortium*

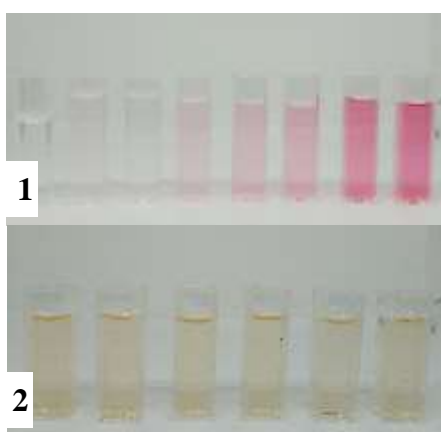
Asam Organik	Konsentrasi (mg l ⁻¹)
Asam Asetat	0,67
Asam Oksalat	0,01
Asam Laktat	1,02
Asam Malat	0,49

Produksi Fitohormon IAA

Pengujian produksi sintesis fitohormon IAA dilakukan menggunakan pereaksi Salkowski (Gordon dan Weber 1951). Nilai absorbansi diperoleh dengan menginterpolasikan persamaan garis dari kurva standar IAA dengan nilai koefisien standar IAA yang diperoleh adalah R²=0,98. Gambar 6.1 merupakan IAA standar setelah direaksikan dengan pereaksi Salkowski. Warna pink sebagai indikator adanya fitohormon IAA. Namun pada hasil reaksi isolat *Bacillus* dengan pereaksi Salkowski tidak terdapat warna pink (Gambar 6.2) meskipun demikian, isolat *Bacillus* memiliki nilai absorbansi setelah diuji pada spektrofotometer. Konsorsium *Bacillus* yang diinkubasi dalam media TSB selama 3 hari mampu memproduksi rata-rata sebesar 3,0065 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fitohormon IAA. Produksi IAA oleh konsorsium *Bacillus* ini tidak terlalu tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian Aroujo *et al.* (2012) *Bacillus* sp. pada rhizosper jagung yang dapat memproduksi IAA antara 3,28 – 21,30 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda dalam mensintesis IAA. Aroujo *et al.* (2012) menyimpulkan bahwa *Bacillus* sp. memproduksi IAA antara 3,28 – 21,30 µg ml⁻¹. Namun pada hasil penelitian Ali *et al.* (2009) *B. megaterium* mampu memproduksi IAA sebanyak 92,70 dan 68,10 µg ml⁻¹ pada media yang disuplemen dengan 1.000 µg ml⁻¹ triptofan.

Fitohormon IAA yang diproduksi oleh rhizobakteri mempengaruhi proses fisiologis tanaman dengan mengubah kandungan auksin pada tanaman. IAA yang disintesis oleh bakteri dapat meningkatkan luas dan panjang permukaan akar, percabangan tunas dan diferensiasi sistem vaskular (Azizi *et al.* 2015) dengan demikian tanaman memiliki akses yang lebih besar bagi penyerapan hara oleh akar.



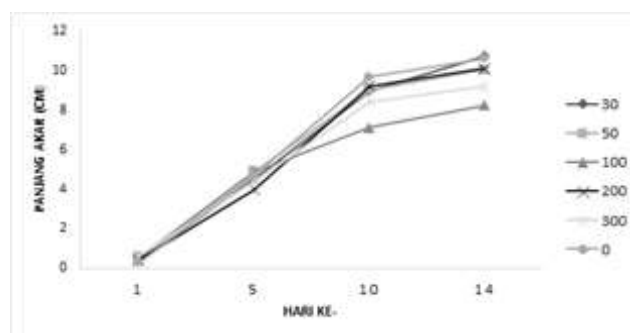
Gambar 6. 1) standar IAA 2) Inokulan konsorsium *Bacillus* setelah direaksikan dengan pereaksi Salkowski

Figure 6. 1) IAA standard; 2) *Bacillus* sp. consortium inoculant after reacting with Salkowski reagent

Uji in planta

Benih padi direndam selama 24 jam dalam larutan pupuk hayati cair yang merupakan sumber isolat konsorsium *Bacillus*. Benih padi yang digunakan IPB3S yang telah tumbuh radikula dipindahkan ke dalam kantong tumbuh yang berisi larutan hara Jensen yaitu larutan hara yang tidak terdapat unsur hara N. Panjang akar padi tidak berbeda nyata antar perlakuan konsentrasi larutan pupuk hayati cair berdasarkan uji Anova 0,5%. Panjang akar paling panjang pada perlakuan kontrol 10,88 cm kemudian perlakuan 30x yaitu 9,90 cm (Gambar 7). Sedangkan banyak akar berbeda nyata, perlakuan pengenceran 30x memiliki paling banyak akar lateral yaitu 7 akar lateral dibandingkan dengan perlakuan lain yang memiliki banyak akar 3 sampai 4 akar lateral (Tabel 4 dan Gambar 8).

Beberapa hasil penelitian lainnya menunjukkan bahwa



Gambar 7. Pertumbuhan akar bibit padi pada perlakuan pengenceran pupuk hayati

Figure 7. Seedling root growth under different biofertilizer dilution treatment

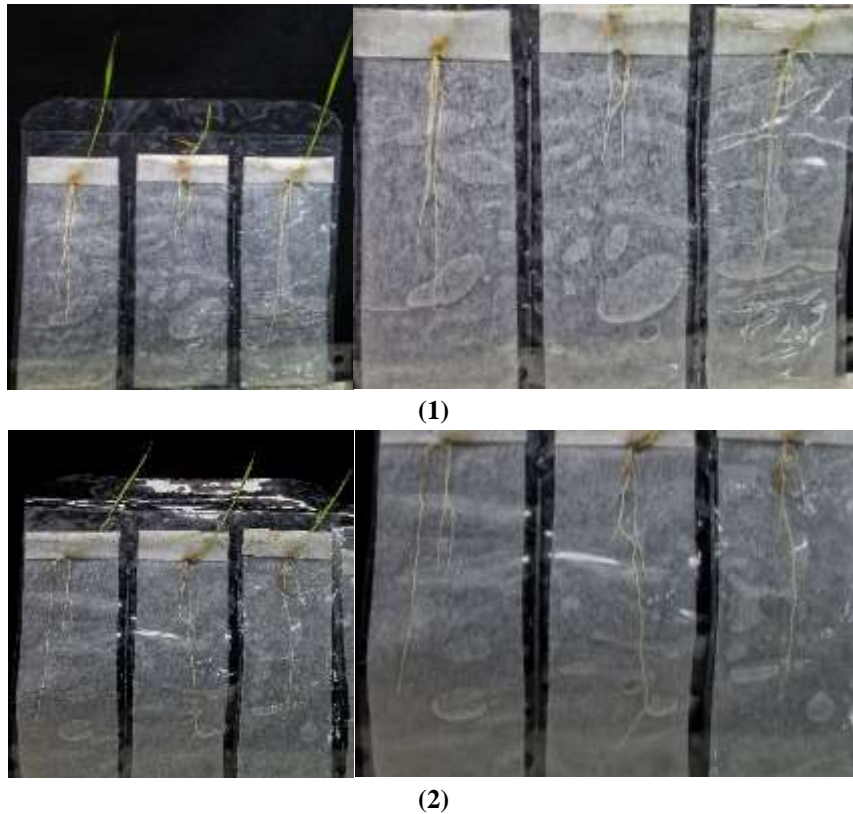
Tabel 4. Jumlah akar padi pada berbagai pengenceran pupuk hayati

Table 4. The number of rice root on various dilutions of biofertilizer

Pengenceran (x)	Banyak Akar
30	7,00 a
50	4,75 b
100	4,25 b
200	4,00 b
300	4,00 b
Kontrol	3,75 b

bakteri *Bacillus* dapat meningkatkan jumlah akar lateral tanaman. *B. altitudinis* strain FD48 mengurangi panjang akar primer, mendukung ketebalan dan perkembangan akar lateral (Ambreetha *et al.* 2018). Pada penelitian Talboys *et al.* (2014) inokulasi *B. amyloliquefaciens* dapat meningkatkan jumlah akar lateral 51%. Menurut Ali *et al.* (2009) meningkatnya produksi IAA oleh *Bacillus* sp. pada tanaman *Vigna radiata* akan menghambat perpanjangan akar primer dan meningkatkan jumlah akar lateral. Sedangkan pada hasil penelitian Xie *et al.* (2015) *B. subtilis* dapat meningkatkan panjang akar padi 25,2% yang diekspresikan oleh gen *srfAA* dan *sinI* secara signifikan. Selain itu inokulasi bakteri menyebabkan perubahan pada morfologi akar karena bakteri mempengaruhi produksi IAA endogen dengan mengatur gen auksin-responsif (Ambreetha *et al.* 2018).

Menurut (Azizi *et al.* 2015) IAA yang disintesis oleh bakteri dapat meningkatkan luas dan panjang permukaan akar, percabangan tunas dan diferensiasi sistem vaskular. IAA juga akan menstimulasi produksi rambut akar pada akar lateral pada tanaman sehingga akan menambah luas permukaan akar dengan demikian akan memberikan akses



Gambar 8. Pertumbuhan akar bibit padi: 1) diinokulasi dan 2) tidak diinokulasi konsorsium *Bacillus*
 Figure 8. Root growth of rice seedlings: 1) inoculated and 2) not inoculated with *Bacillus* consortium

yang lebih besar untuk penyerapan hara tanah dan air (Vessey 2003; Davies 2004). Hal ini akan mempengaruhi peningkatan laju penyerapan hara sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman padi.

Kesimpulan

Konsorsium *Bacillus* pada pupuk hayati cair yang diuji memiliki kemampuan memfiksasi N_2 , melarutkan fosfat dengan memproduksi asam organik serta mensintesis fitohormon IAA. Aktivitas nitrogenase pada konsorsium *Bacillus* terdeteksi sebesar $0,05685 \mu\text{m ml}^{-1} \text{jam}^{-1}$. Selain dapat melarutkan fosfat dari sumber $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ karena adanya asam asetat, asam oksalat, asam laktat, dan asam malat dengan kisaran sekitar $0,01-1,02 \text{ mg l}^{-1}$, konsorsium *Bacillus* juga mensekresikan $3,0065 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAA.

Inokulasi konsorsium *Bacillus* dapat meningkatkan jumlah akar lateral bibit padi 42,8%. Peningkatan jumlah akar lateral ini diharapkan dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman padi.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah mendanai penelitian dan kepada Balai Penelitian Tanah yang telah menyediakan fasilitas laboratorium untuk penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Abdallah DB, Gargouri OF, Tounsi S. 2018. Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. *Biology Control* 124:61-67.
- Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:519-526.
- Ambretha S, Chinnadurai C, Marimuthu P, Balachandar D. 2018. Plant associated *Bacillus* modulates the expression of auxin responsive genes of rice and modifies the root architecture. *Journal of Rhizosphere* 5:57-66.
- Arashida H, Kugenuma T, Watanabe M, Maeda I. 2018. Nitrogen fixation in *Rhodospseudomonas palustris* co-cultured with *Bacillus subtilis* in the presence of air. *Journal Bioscience Bioengineering* 127:589-593.
- Araujo FF, Souza EC, Guerreiro RT, Guaberto LM, Aroujo ASF.

2012. Diversity and growth promoting activities of *Bacillus* sp. in maize. *Revista Caatinga* 25:1-7.
- Azizi P, Rafii MY, Maziah M, Abdullah SNA, Hanafi MM, Latif MA, Rashid AA, Sahebi M. 2015. Understanding the shoot apical meristem regulation; a study of phytohormones, auxin and cytokinin in rice. *Mechanisms of Development* 135:1-15.
- Baziramakenga R, Simard RR, Leroux GD. 1995. Determination of organic acid in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry* 3:349-356.
- Beever RE, Bollard EG. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *The Journal of General and Applied Microbiology* 60:273-279.
- Bianco C, Defez R. 2010. Improvement of phosphate solubilization and medicago plant yield by an indole-3-acetic acid overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:4626-4632.
- Borriess R. 2015. *Bacillus*, a Plant Beneficial Bacterium. p 379-391. In Lugtenberg B (Ed). *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer Publishing., Switzerland.
- Bruijn FJ. 2015. Biological Nitrogen Fixation. p. 215-256. In Lugtenburg B (Ed). *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer Publishing., Switzerland.
- Davies PJ. 2004. *Plant Hormones; Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Springer. 802p.
- Dobereiner J, Marriell IE, Nery M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology* 22:1464-1473.
- Fredrickson JK. 2015. Ecological communities by design. Synthetic ecology requires knowledge of how microbial communities function. *Science* 348:1425-1427.
- Glick BR. 2012. Plant growth promoting bacteria mechanism and applications. *Science* 2012:1-15.
- Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43:1183-1207.
- Hopkins DW, Dungait JAJ. 2010. Soil microbiology and nutrient cycling. *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. In Dixon GR, Tilston EL (Ed). Springer, Switzerland.
- Jarak M, Mrkovacki N, Bjelic D, Josic D, Jafari TH, Stamenov D. 2012. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research* 6:5683-5690.
- Jansen HL. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants II is symbiotic nitrogen fixation influenced by *Azotobacter*. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 57:205-212.
- Kumar A, Rai LC. 2017. Soil organic carbon and availability of soil phosphorus regulate abundance of culturable phosphate solubilizing bacteria in paddy fields of the Indo-Gangetic Plain. *Pedosphere*. (in press)
- Kumar J, Saraf M. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Agricultural Research and Development* 5:108-119.
- MacFaddin JF. 1986. Media for isolation identification maintenance of medical bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 4:240.
- Mrkovacki N, Dalovic I, Josic D. 2016. The effect of PGPR strains on microbial abundance in maize rhizosphere in field conditions. *Ratarstvo i Povrtarstvo* 53:15-19.
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:197.
- Rascio N, Rocca N. 2013. Biological nitrogen fixation. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier. 2:264-279.
- Salam AK. 2014. *Enzymes in Tropical Soils*. Global Madani Press, Bandar Lampung.
- Setiawati MR, Suryatmana P, Hindersah R, Fitriatin BN, Herdiyantoro D. 2014. Karakterisasi isolat bakteri pelarut fosfat untuk meningkatkan ketersediaan P pada media kultur cair tanaman jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik* 16:30-34.
- Schindler J. 1993. Dynamics of *Bacillus* colony growth. *Elsevier Science* 1:333-338.
- Simanungkalit RDM, Suriadikarta DA, Saraswati R, Setyorini D, Hartatik W. 2006. *Pupuk Organik dan Pupuk Hayati*. Bogor. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiology* 31:425-448.
- Sundara Rao WVB, Sinha MK. 1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural and Science* 33:272-278.
- Talboys PJ, Owen DW, Healey JR, Withers PJ, Jones DL. 2014. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *MBC Plant Biology* 14:51.
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability. *Molecules* 21:537.
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Xie S, Wu H, Chen L, Zang H, Xie Y, Gao X. 2015. Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiology* 15:21.
- Zeigler DR, Perkins JB. 2008. The genus *Bacillus*. *Practical Handbook of Microbiology*. In Goldman E, Green LH (Ed). CRC Press, New York. 2nd ed.
- Zou LF, Wang XP, Xiang Y, Zhang B, Li YR, Xiao YL, Wang JS, Walmsley AR, Chen GY. 2006. Elucidation of the hrp cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6212-6224.