

Karakter Rhizobakteri Pelarut Fosfat Potensial dari Rhizosfer Tumbuhan Mangrove Teluk Awur Kabupaten Jepara secara Mikrobiologi

Eka Oktaviani¹, Arina Tri Lunggani², dan Rejeki Siti Ferniah²

¹ Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman; e-mail: oktaviani@unsoed.ac.id

² Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro

ABSTRAK

Ekosistem mangrove Teluk Awur yang terletak di Kabupaten Jepara, Provinsi Jawa Tengah, merupakan salah satu ekosistem mangrove yang mengalami kerusakan cukup parah karena perluasan lahan budidaya ikan (tambak), sehingga mendorong terjadinya erosi pantai. Peremajaan kembali dan konservasi ekosistem mangrove dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri tanah yang mampu mendukung pertumbuhan tanaman atau yang biasa disebut *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Salah satu mekanisme pendukung pertumbuhan tanaman oleh kelompok PGPR adalah dengan aktivitas pelarutan fosfat karena fosfat dalam tanah berada dalam bentuk yang sulit diserap oleh tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat Rhizobakteri pelarut fosfat yang unggul dalam melarutkan fosfat secara *in-vitro* dan mengetahui karakter isolat yang diperoleh. Isolasi dan penapisan rhizobakteri pelarut fosfat dilakukan menggunakan medium Pikovskaya agar. Karakterisasi isolat potensial dilakukan secara mikrobiologi dan atau uji aktivitas biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rhizobakteri pelarut fosfat potensial yang berhasil diisolasi, secara mikrobiologi teridentifikasi ke dalam genus *Enterobacter*.

Kata kunci: Karakterisasi, Rhizobakteri, Fosfat, Teluk Awur, *Enterobacter*

ABSTRACT

Mangrove ecosystem of Teluk Awur, which is located in Jepara Regency, is one of the mangrove ecosystems that suffered severe damage due to the expansion of fish farming land (ponds). Rejuvenation and conservation of mangrove ecosystems can be done by using bacteria that support mangrove plant growth, which commonly called *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). One of the supporting mechanisms of plant growth by the PGPR group can be carried out with phosphate dissolving activity because phosphate in the soil is in a form that is difficult to absorb by plants. This study aims to obtain potential phosphate solubilizer Rhizobacteria in dissolving phosphate *in-vitro* and to determine character of the obtained isolate. Isolation and screening of potential phosphate solubilizer Rhizobacteria were carried out using Pikovskaya agar medium. Microbiological characterization of potential isolate was carried out based on microbiological and/or biochemical activity. The results showed that potential phosphate solubilizer Rhizobacteria, microbiologically identified as *Enterobacter*.

Keywords: Characterization, Rhizobacterium, Phosphate, Teluk Awur, *Enterobacter*

Citation: Oktaviani, E., Lunggani, A.T., dan Ferniah, R.S. (2020). Karakterisasi Rhizobakteri Pelarut Fosfat Potensial dari Rhizosfer Tumbuhan Mangrove Teluk Awur Kabupaten Jepara secara Mikrobiologi. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 18(1), 58-66, doi:10.14710/jil.18.1.58-66

1. Latar Belakang

Hariyono (2007) menuliskan bahwa salah satu ekosistem mangrove di pesisir utara Pulau Jawa yang mengalami kerusakan ekosistem cukup parah adalah ekosistem mangrove Teluk Awur yang terletak di Kabupaten Jepara Jawa Tengah. Kerusakan ekosistem daerah ini terjadi karena perluasan lahan budidaya ikan (tambak) di kawasan Kabupaten Jepara sehingga mendorong terjadinya erosi pantai. Peremajaan kembali dan konservasi ekosistem mangrove merupakan suatu hal penting yang dapat dilakukan di daerah tersebut dengan penanaman kembali dan pemeliharaan komponen penyusun hutan mangrove.

Salah satu metode yang dapat mendukung cara tersebut adalah dengan menggunakan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) untuk meningkatkan perkembangan mangrove baik secara alami maupun buatan (Sahoo & Dahl, 2009).

Kelompok PGPR merupakan kelompok bakteri tanah yang mampu meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui beberapa mekanisme pendukung (Thuller *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Dewi, 2007; Bariusso *et al.*, 2008; Sahoo & Dahl, 2009; Dastager *et al.*, 2009; Ahemad & Khan, 2010). Mekanisme pendukung pertumbuhan tanaman dapat berupa peningkatan ketersediaan nutrisi (melalui

penambahan nitrogen secara biologis), produksi substansi pengatur pertumbuhan (auksin, sitokinin, giberelin, dan etilen), peningkatan kemampuan hidup tanaman (melalui aktivitas kompetisi untuk mendapatkan nutrisi yang dibutuhkan tanaman), peningkatan penyerapan nutrisi tanaman (melalui aktivitas pelarutan fosfat), perbaikan struktur tanah dan perlindungan tanaman terhadap patogen dan mikroorganisme penyebab penyakit yang merugikan tanaman (melalui aktivitas pengendalian secara biologi terhadap patogen tertentu) (Dastager *et al.*, 2009; Ahemad & Khan, 2010; Girish *et al.*, 2010). Mekanisme pendukung pertumbuhan tanaman dengan peningkatan penyerapan nutrisi yang dibutuhkan dapat dilakukan melalui aktivitas pelarutan fosfat, karena fosfat dalam tanah berada dalam bentuk senyawa yang sulit diserap oleh tanaman (Mehta & Nautiyal, 2001; Sahoo & Dahl, 2009; Girish *et al.*, 2010).

Penelitian tentang penerapan PGPR untuk peremajaan kembali dan konservasi ekosistem mangrove di Indonesia masih sangat sedikit, sementara ekosistem mangrove memiliki fungsi penting yang berhubungan dengan perlindungan daerah pesisir pantai. Pengetahuan tentang asosiasi Rhizobakteri dengan ekosistem mangrove belum banyak diketahui (Bharathkumar *et al.*, 2008; Sahoo & Dahl, 2009). Pengetahuan tentang mikroorganisme yang terdapat di lingkungan dengan kondisi salinitas tertentu masih terbatas apabila dibandingkan dengan mikroorganisme darat (Mishra *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat rhizobakteri pelarut fosfat potensial dari rhizosfer tumbuhan mangrove Teluk Awur Kabupaten Jepara dan mengetahui karakter isolat tersebut secara mikrobiologi dan atau aktivitas biokimiawi. Penelitian tentang mikroorganisme menguntungkan dari kelompok PGPR tersebut menjadi hal yang penting dilakukan dalam pencapaian tujuan pemeliharaan dan konservasi ekosistem mangrove di kawasan mangrove Teluk Awur, Kabupaten Jepara, Provinsi Jawa Tengah.

2. Metode Penelitian

Pengambilan sampel tanah rhizosfer mangrove dilakukan di ekosistem mangrove Teluk Awur Kabupaten Jepara. Proses isolasi, penapisan isolat potensial dan karakterisasi secara mikrobiologi dan atau aktivitas biokimia dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Analisis kandungan fosfat total dalam sampel tanah dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

2.1. Pengambilan sampel tanah rhizosfer tumbuhan mangrove

Tanah rhizosfer dikumpulkan dengan metode *Purposive Sampling* (Fachrul, 2007) berdasarkan jenis tumbuhan yang berbeda, yaitu *Sonneratia sp.*, *Rhizophora sp.* dan *Calotropis gigantea*. Tanah rhizosfer diambil di sekitar perakaran pada jarak 1-2 mm pada empat titik pengambilan sampel untuk masing-masing rhizosfer tumbuhan mangrove. Sebanyak kurang lebih $\frac{1}{4}$ kg sampel tanah dari masing-masing pengambilan satu tumbuhan mangrove tersebut disimpan dalam plastik hitam dalam kondisi segar untuk dibawa ke laboratorium.

2.2. Analisis kandungan fosfat total dalam sampel tanah

Sampel tanah dari ketiga rhizosfer tumbuhan mangrove dikirimkan ke laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia FSM UNDIP sebanyak 10 g untuk dilakukan analisis terhadap kandungan fosfat total. Analisis dilakukan dengan menggunakan metode Pengasaman *Stannous Chloride* untuk semua jenis sampel tanah.

2.3. Isolasi Rhizobakteri pelarut fosfat dari sampel tanah

Teknik isolasi dilakukan menurut metode dari Waluyo (2008) dengan modifikasi. Sebanyak 10 g tanah segar diencerkan ke dalam 90 ml akuades steril. Suspensi yang terbentuk dihomogenkan, kemudian sebanyak 1 ml aliquot dipindahkan dengan mikropipet steril ke dalam tabung reaksi steril yang telah berisi 9 ml akuades steril. Suspensi dihomogenkan selama 10 detik dan dilakukan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-5} . Suspensi tanah masing-masing 0,1 ml ditaburkan ke dalam cawan petri yang kemudian diisi dengan medium Pikovskaya (PVK) agar (Banerjee *et al.*, 2010). Kultur diinkubasi selama 6 hari pada suhu 25°C. Zona bening yang mengelilingi koloni menunjukkan aktivitas pelarutan fosfat anorganik dalam medium tersebut. Semua koloni yang menghasilkan zona bening diambil untuk dimurnikan pada medium yang baru (Bharathkumar *et al.*, 2008).

2.4. Penampisan isolat unggul Rhizobakteri pelarut fosfat lokal

Semua isolat diperkaya dalam medium *Nutrient Broth* (NB). Kultur kemudian diinkubasi dalam pengocok orbital dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar. Analisis kuantitatif fosfat terlarut dilakukan dengan menginokulasikan sel dengan kepadatan sebanyak $\pm 10^8$ cfu/ml untuk masing-masing kultur bakteri. Pertumbuhan bakteri diamati setelah inokulasi hari ke-7. Daerah bening yang mengelilingi koloni pertumbuhan bakteri kemudian diukur untuk diketahui efisiensi pelarutan fosfat masing-masing bakteri yang diuji. Efisiensi pelarutan

fosfat dihitung berdasarkan rumus dari Girish *et al.* (2010), yang membandingkan diameter pelarutan fosfat dalam medium dengan diameter koloni yang terbentuk.

$$EP = \frac{\text{Diameter Pelarutan}}{\text{Diameter Koloni}}$$

2.5. Karakterisasi isolat Rhizobakteri pelarut fosfat potensial

Karakterisasi Morfologi Koloni Rhizobakteri (Cappuccino & Sherman, 1987)

Koloni isolat Rhizobakteri potensial diamati warna, tepian, bentuk dan elevasi koloni dalam medium *Nutrient Agar* (NA). Karakter koloni dalam medium cair juga diamati dalam medium NB.

Karakterisasi Morfologi Sel Rhizobakteri

Morfologi sel diamati dengan pewarnaan gram (Cappuccino & Sherman, 1987). Satu ose isolat Rhizobakteri kemudian disuspensikan ke dalam akuades steril dan difiksasi di atas kaca benda bersih. Olesan Rhizobakteri diberi 2-3 tetes pewarna kristal violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan Rhizobakteri digenangi dengan 2 tetes larutan lugol's iodine (gram B), dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan dicuci dengan larutan alkohol aseton (gram C) selama 30 detik. Zat pewarna berlebih dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan diberi cat safranin (gram D) selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (1000x) menggunakan minyak emersi. Bakteri gram negatif akan berwarna merah, sedangkan gram positif akan berwarna ungu.

Karakterisasi Aktivitas Biokimia Rhizobakteri

Uji Hidrolisis Pati

Uji ini dilakukan berdasarkan metode Cappuccino & Sherman (1987). Uji hidrolisis pati positif terdapat daerah bening pada medium yang mengandung pati setelah penambahan larutan lugol.

Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji ini dilakukan berdasarkan metode Cappuccino & Sherman (1987). Uji fermentasi karbohidrat positif jika warna merah medium fermentasi berubah menjadi kuning (bakteri melakukan fermentasi gula dan menghasilkan asam). Gelembung yang terdapat dalam tabung Durham menunjukkan bahwa fermentasi tersebut juga menghasilkan gas karbondioksida (CO₂).

Uji Penggunaan Sitrat

Uji ini dilakukan berdasarkan metode Cappuccino & Sherman (1987). Satu ose isolat Rhizobakteri ditanam pada medium Simmon Sitrat

Agar miring. Kultur diinkubasi selama 24 hingga 48 jam. Perubahan yang terjadi diamati dan dicatat. Uji positif penggunaan sitrat ditunjukkan jika terjadi perubahan warna medium hijau menjadi biru.

Uji Produksi Indol

Uji ini dilakukan berdasarkan metode Cappuccino & Sherman (1987). Uji indol positif jika terbentuk cincin merah di permukaan medium dengan penambahan tiga tetes pereaksi Kovac's.

Uji Aktivitas Enzim Katalase

Uji ini dilakukan berdasarkan metode Cappuccino & Sherman (1987). Uji ini positif jika terdapat gelembung gas oksigen (O₂) pada biakan yang diuji dengan larutan H₂O₂ 3%.

Karakter Pertumbuhan Isolat dengan Variasi Faktor Lingkungan (Cappuccino & Sherman, 1987)

Suhu

Satu ose isolat Rhizobakteri dari medium NA miring kemudian diinokulasikan dengan ose bulat ke dalam medium NB steril dengan tiga kali ulangan. Suspensi kemudian diinkubasikan ke dalam tiga variasi suhu, yaitu 25°C, 37°C dan 47°C selama kurang lebih 24 jam. Satu tabung medium NB steril tanpa inokulasi bakteri juga diinkubasikan ke dalam inkubator dengan berbagai variasi suhu tersebut sebagai kontrol perlakuan. Hasil pengamatan kualitatif pertumbuhan dalam variasi suhu kemudian diamati dengan kontrol sebagai pembanding.

Salinitas (Kadar Garam)

Satu ose isolat Rhizobakteri dari medium NA miring kemudian diinokulasikan dengan ose bulat ke dalam medium NB steril yang telah dimodifikasi oleh beberapa konsentrasi salinitas dengan tiga kali ulangan. Salinitas medium NB diatur sebesar 0,85% (w/v), 5% (w/v), 10% (w/v) dan 15% (w/v). Suspensi kemudian diinkubasikan dalam suhu kamar selama kurang lebih 24 jam. Satu tabung medium NB steril tanpa inokulasi bakteri juga diinkubasikan ke dalam inkubator dengan berbagai variasi salinitas tersebut sebagai kontrol perlakuan. Hasil pengamatan kualitatif pertumbuhan dalam variasi salinitas kemudian diamati dengan kontrol sebagai pembanding.

Derajat Keasaman (pH)

Satu ose isolat Rhizobakteri dari medium NA miring kemudian diinokulasikan dengan ose bulat ke dalam medium NB steril yang telah dimodifikasi oleh beberapa tingkatan pH dengan tiga kali ulangan. Salinitas medium NB diatur sebesar 3, 5, 7 dan 9. Suspensi kemudian diinkubasikan dalam suhu kamar selama kurang lebih 24 jam. Satu tabung medium NB steril tanpa inokulasi bakteri juga diinkubasikan ke dalam inkubator dengan berbagai variasi pH tersebut sebagai kontrol perlakuan. Hasil pengamatan

kualitatif pertumbuhan dalam variasi pH kemudian diamati dengan kontrol sebagai pembanding.

Kebutuhan Oksigen

Satu ose isolat Rhizobakteri dari medium NA miring kemudian diinokulasikan dengan ose bulat ke dalam medium NB steril. Satu seri medium NB steril yang telah diinokulasikan oleh biakan bakteri ditumbuhkan dalam kondisi aerob untuk mengetahui pengaruh oksigen bebas terhadap pertumbuhan bakteri secara kualitatif. Seri suspensi medium NB steril dengan biakan bakteri ditumbuhkan dalam kondisi anaerob dalam *anaerobic jar*. Suspensi kemudian diinkubasikan dalam suhu kamar selama kurang lebih 24 jam. Satu tabung medium NB steril tanpa inokulasi bakteri juga diinkubasikan sebagai kontrol perlakuan. Hasil pengamatan kualitatif pertumbuhan dalam kondisi aerob dan anaerob kemudian diamati dengan kontrol sebagai pembanding. Isolat potensial kemudian dikelompokkan ke dalam organisme anaerob, aerob dan fakultatif anaerob sesuai dengan hasil pengamatan pertumbuhan kualitatif dalam kedua kondisi oksigen tersebut.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi dan penampisan Rhizobakteri pelarut fosfat potensial

Isolasi rhizobakteri pelarut fosfat dari tiga sampel tanah rhizosfer tumbuhan mangrove *Sonneratia* sp., *Rhizophora* sp. dan *Calotropis gigantea* mendapatkan 8 isolat dengan karakter morfologi koloni yang tertera pada Tabel 1.

Penelitian isolasi rhizobakteri pelarut fosfat menunjukkan keberadaan rhizobakteri pada semua sampel tanah rhizosfer yang diteliti. Bharathkumar *et al.* (2008) menjelaskan bahwa keberadaan rhizobakteri pelarut fosfat pada sampel tanah rhizosfer mangrove yang diteliti menunjukkan adanya siklus nutrisi dalam ekosistem ini. Daerah eksudat akar secara umum merupakan daerah yang menyediakan berbagai sumber nutrisi untuk kehidupan mikroorganisme di ekosistem lahan mangrove (Sudha Nair *et al.*, 2008). Nutrisi-nutrisi berupa senyawa metabolit yang dilepaskan oleh tanaman melalui akar berupa senyawa gula, asam amino, asam organik, glikosida, senyawa nukleotida, vitamin, enzim, dan senyawa indol (Rodriguez & Fraga, 1999).

Sementara itu, Kothamasi *et al.* (2006) melaporkan bahwa perakaran *Rhizophora* sp. dan *Sonneratia* sp. memiliki akar nafas (pneumatofora) yang mampu mendukung pergerakan oksigen ke daerah akar yang terendam. Cooke *et al.* (1993) dan Brown & Bledsoe (1996) dalam Kothamasi *et al.* (2006) menuliskan bahwa akar yang terendam tersebut, seperti tanaman-tanaman akuatik lainnya, memiliki korteks aerenkim, dengan jaringan-jaringan yang dilaporkan mampu menyediakan oksigen untuk akar dan mendukung kolonisasi dan ketahanan hidup *Arbuscular Mycorrhizae Fungus* (AMF) pada tanaman yang tumbuh pada habitat yang tergenang air.

Kedelapan isolat yang didapat menunjukkan penampakan koloni yang berbeda-beda, ditinjau dari bentuk, warna, dan elevasi koloni. Sejalan dengan penelitian ini, penelitian Nisa' (2018) mendapatkan 3 (tiga) isolat bakteri pelarut fosfat dengan karakter koloni; bentuk yang ketiganya bulat; elevasi datar, datar, dan rata; dan warna putih susu, putih, dan kuning. Karakter-karakter koloni ini digunakan sebagai pembeda awal isolat yang diperoleh, untuk proses karakterisasi selanjutnya.

Kedelapan isolat yang didapat menunjukkan penampakan koloni yang berbeda-beda, ditinjau dari bentuk, warna, dan elevasi koloni. Sejalan dengan penelitian ini, penelitian Nisa' (2018) mendapatkan 3 (tiga) isolat bakteri pelarut fosfat dengan karakter koloni; bentuk yang ketiganya bulat; elevasi datar, datar, dan rata; dan warna putih susu, putih, dan kuning. Karakter-karakter koloni ini digunakan sebagai pembeda awal isolat yang diperoleh, untuk proses karakterisasi selanjutnya.

Tabel 1. Morfologi Koloni Rhizobakteri Pelarut Fosfat dari Tiga Sampel Tanah Rhizosfer Tumbuhan Mangrove yang Berbeda (berdasarkan Cappucino & Shermann, 1987)

Isolat	Asal Rhizosfer	Bentuk koloni	Warna	Elevasi
EO-1	<i>Sonneratia</i> sp.	Tak beraturan	Krem	Datar
EO-2	<i>Sonneratia</i> sp.	Bulat	Transparan	Umbonate
EO-3	<i>Rhizophora</i> sp.	Tak beraturan	Transparan	Umbonate
EO-4	<i>Rhizophora</i> sp.	Oval	Krem	Datar
EO-5	<i>Rhizophora</i> sp.	Bulat	Putih susu	Umbonate
EO-6	<i>C.gigantea</i>	Bulat	Kuning	Umbonate
EO-7	<i>C.gigantea</i>	Bulat	Hijau	Umbonate
EO-8	<i>C.gigantea</i>	Tak beraturan	Putih susu	Umbonate

Sumber nutrisi dan berbagai faktor fisik serta kimia yang terdapat dalam sampel tanah yang diteliti dapat mempengaruhi keberadaan rhizobakteri pelarut fosfat dalam tanah. Karakter sampel tanah rhizosfer yang diteliti dapat dilakukan dengan pengamatan warna fisik tanah. Collins (2003) dan Krull *et al.* (2005) menjelaskan bahwa warna tanah merupakan parameter yang paling mudah digunakan untuk menentukan sifat-sifat tanah yang diteliti. Warna tanah dapat dihubungkan dengan beberapa sifat fisik, kimia dan biologi tanah. Analisis kuantitatif kandungan kimia tanah unsur fosfor (P) juga telah

dilakukan untuk mengetahui jumlah P yang terdapat dalam sampel tanah sebagai bahan yang dapat dilarutkan oleh rhizobakteri pelarut fosfat, sehingga dapat diserap oleh tumbuhan, khususnya tumbuhan mangrove. Hasil analisis kandungan rata-rata total P dalam sampel tanah yang diteliti menunjukkan bahwa tanah yang berwarna coklat kehitaman memiliki kandungan P tertinggi jika dibandingkan dengan dua jenis sampel tanah lain yang memiliki warna merah. Karakter warna tanah dan kandungan P dalam masing-masing sampel tanah rhizosfer yang diteliti dapat dilihat pada Tabel 2.

Kandungan P (529, 164 mg/kg) tertinggi dalam sampel tanah rhizosfer mangrove tumbuhan *Rhizophora* sp. yang berwarna coklat kehitaman sedangkan tanah yang berwarna coklat kemerahan memiliki kandungan P terendah (168,422 mg/kg). Channarayappa & Biradar (2019) menuliskan bahwa warna tanah memberikan informasi tentang kandungan bahan organik, tingkat drainase, aktivitas biotik, dan kesuburan tanah. Lebih lanjut Channarayappa & Biradar (2019) menuliskan bahwa adanya substrat organik pada tanah dicirikan dengan

warna tanah yang lebih gelap, adanya oksida besi pada tanah dapat memberikan warna lapisan coklat dan kemerahan, adanya senyawa karbonat dapat menimbulkan warna keputih-putihan sebagian, dan adanya kondisi reaksi oksidasi (oksida besi yang tereduksi) dapat memberikan warna abu-abu dan kehijau-hijauan sebagian. Sehingga, lebih lanjut dituliskan oleh Channarayappa & Biradar (2019), bahwa perkembangan dan distribusi warna pada profil tanah dihasilkan dari proses biologis dan kimiawi, khususnya reaksi oksidasi-reduksi.

Tabel 2. Karakter Warna Tanah dan Total Kandungan Fosfor dalam Tiga Sampel Tanah Rhizosfer yang Diteliti

Kode Sampel Tanah	Rhizosfer Tumbuhan Mangrove	Warna Tanah	Kandungan P (mg/kg)
1	<i>Sonneratia</i> sp.	Merah kecoklatan	233,527
2	<i>Rhizophora</i> sp.	Coklat kehitaman	529,164
3	<i>C.gigantea</i>	Coklat kemerahan	168,422

Keterangan :

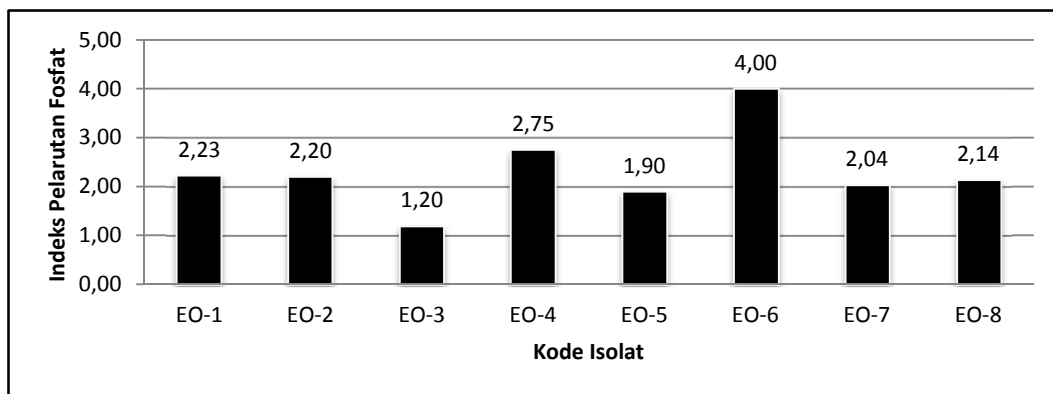
- Kandungan P menunjukkan jumlah total unsur P dalam senyawa fosfat, baik yang terdapat dalam senyawa yang tersedia maupun yang tidak tersedia untuk tumbuhan

Kandungan total unsur P dalam tanah merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi jumlah P dalam tanah yang dapat diserap oleh tumbuhan, disamping faktor lain seperti jenis tanah, pH tanah, suhu, pertukaran udara, kelembapan udara dan kandungan nutrisi lain dalam tanah (Hodges, tanpa tahun). Keberadaan rhizobakteri pelarut fosfat dalam sampel tanah juga dapat mempengaruhi jumlah P yang dapat diserap oleh tumbuhan karena kemampuan rhizobakteri dalam melakukan pelarutan fosfat. Faktor-faktor fisik dan kimia tanah seperti pH tanah, suhu, pertukaran udara, kelembapan udara dan kandungan nutrisi juga merupakan faktor yang menentukan keberadaan rhizobakteri pelarut fosfat karena jenis rhizobakteri ini juga membutuhkan kondisi tertentu dalam mendukung mekanisme pelarutan fosfat dalam tanah.

Di India, sebagai negara dengan iklim yang sama dengan Indonesia, yakni iklim tropis, rata-rata kandungan total P pada tanah yang berwarna hitam pada kedalaman sekitar 0-30 cm di zona yang berbeda, bervariasi dari 275 mg/kg (di daerah basah) hingga 459 mg/kg (di daerah semi kering). Tanah yang berwarna merah di India memiliki rata-rata kandungan total P (pada kedalaman antara 0-30 cm)

yang bervariasi dari 184 mg/kg (di daerah semi kering) hingga 854 mg/kg (di daerah basah). Kandungan P dalam sampel tanah yang diteliti berada dalam jangkauan antara 168, 422 mg/kg hingga 529, 164 mg/kg. Nilai kandungan P dalam bentuk senyawa fosfat ini berada dalam jangkauan kandungan P sampel tanah di India pada beberapa jenis warna tanah yang diteliti oleh Ramesh *et al.* (2007). Pritchard (2005) juga melaporkan bahwa kandungan total P (kedalaman antara 0-10 cm) dari tanah yang terdapat di lembah Bakers, di sebelah barat daya Australia adalah sebesar 69 mg/kg dan dikategorikan dalam status unsur P yang rendah dalam tanah.

Kedelapan isolat rhizobakteri pelarut fosfat dilakukan penapisan dengan mengacu pada penelitian Girish *et al.* (2010). Hasil penapisan kemampuan pelarutan fosfat dapat dilihat pada Gambar 1. Penggunaan angka indeks pelarutan fosfat untuk mengetahui kemampuan pelarutan fosfat secara *in-vitro* telah digunakan oleh beberapa peneliti (Ahemad & Khan, 2010; Calvo *et al.*, 2010; Girish *et al.*, 2010; Carmo *et al.*, 2011). Besar indeks pelarutan fosfat menunjukkan efisiensi relatif dari isolat mikroorganisme yang diteliti terhadap kemampuan



Gambar 1 Indeks Pelarutan Fosfat Isolat Rhizobakteri Pelarut Fosfat dalam Medium Pikovskaya Agar selama 7 Hari

menghasilkan zona bening pada medium uji karena adanya produksi asam organik dan enzim fosfatase yang dikeluarkan di sekeliling koloni mikroorganisme tertentu (Mehta & Nautiyal, 2001; Ginting *dkk.*, 2005; Jha *et al.*, 2009). Zona bening menunjukkan aktivitas rhizobakteri dalam melarutkan fosfat dalam medium uji, yaitu jenis trikalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Isolat yang menunjukkan indeks pelarutan fosfat tertinggi digunakan untuk identifikasi selanjutnya, yaitu isolat dengan kode EO-6 dan indeks pelarutan fosfat sebesar 4,00. Isolat EO-6 merupakan isolat yang berhasil diperoleh dari tanah rhizosfer tumbuhan *C. gigantea*.

3.2. Karakterisasi Rhizobakteri Pelarut Fosfat Potensial

Isolat EO-6 merupakan isolat yang memiliki indeks pelarutan fosfat tertinggi, namun hanya bisa ditumbuhkan pada subkultur ketiga hingga keempat. Hal ini dapat disebabkan karena sebagian besar organisme Prokariota sampai saat ini sulit untuk dapat dikulturkan pada medium buatan karena keterbatasan untuk dapat menyamai kondisi sesungguhnya di alam (Suwanto, 1994; Pangastuti, 2006). Sebesar kurang lebih hanya 1% dari seluruh Prokariota yang terdapat di alam, yang dapat dikulturkan di laboratorium (Kirk *et al.*, 2004). Isolat EO-4 yang memiliki indeks pelarutan fosfat sebesar 2,75 digunakan untuk tahap karakterisasi selanjutnya. Karakterisasi mikrobiologi dilakukan dengan mengamati morfologi, aktivitas biokimia dan kemampuan pertumbuhan dalam beberapa faktor lingkungan, yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Karakter isolat potensial dengan kode EO-4 ini merupakan bakteri gram negatif. Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa pewarnaan gram merupakan jenis pewarnaan diferensiasi, yang dapat digunakan sebagai metode penting dalam mengelompokkan dan membedakan mikroorganisme. Lebih lanjut Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa reaksi pewarnaan gram ini berdasarkan pada perbedaan komposisi kimia dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih tipis dan dilapisi dengan lapisan terluar (*outer membrane*) yang terdiri dari senyawa lipid (Fardiaz, 1989; Cappuccino & Sherman, 2014). Peptidoglikan adalah polisakarida yang terdiri dari dua subunit kimia yang hanya ditemukan pada dinding sel bakteri, yakni *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic acid* (Cappuccino & Sherman, 2014).

Isolat yang diteliti bereaksi negatif terhadap reaksi hidrolisis pati dalam medium padat. Menurut Cappuccino & Sherman (2014), pati merupakan molekul dengan berat molekul besar (makromolekul), yang merupakan polimer bercabang dan terdiri dari molekul glukosa yang dihubungkan dengan ikatan bi-

glikosidik. Lebih lanjut Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa degradasi awal makromolekul ini membutuhkan kehadiran enzim ekstraseluler, yakni amilase, untuk reaksi hidrolisis menjadi polisakarida yang lebih pendek, yang disebut sebagai dekstrin, dan selanjutnya menjadi molekul maltosa. Selanjutnya, disakarida maltosa ini akan dihidrolisis lagi sehingga didapatkan molekul gula sederhana berupa glukosa, yang ditranspor ke dalam sel dan masuk ke dalam reaksi glikolisis untuk konversi menjadi ATP (Cappuccino & Sherman, 2014).

Isolat ini bereaksi positif terhadap pengujian hidrolisis sitrat. Menurut Cappuccino & Sherman (2014), pada ketidakhadiran glukosa atau laktosa yang terfermentasi, beberapa mikroorganisme mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon untuk memenuhi kebutuhan energi. Adanya enzim *citrate permease* yang membantu transpor sitrat ke dalam sel menjadi kunci berlangsungnya reaksi tersebut (Cappuccino & Sherman, 2014). Berg *et al.* (2002) menuliskan bahwa dalam siklus ini, akan dihasilkan beberapa produk, yakni 2 (dua) molekul CO_2 , satu molekul GTP, dan elektron berenergi tinggi dalam bentuk NADH dan FADH_2 . Selama reaksi ini, medium menjadi basa, karena CO_2 yang dihasilkan bereaksi dengan Na dan air untuk membentuk natrium karbonat, produk yang bersifat basa (Cappuccino & Sherman, 2014). Lebih lanjut Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa keberadaan natrium karbonat mengubah indikator Brom Thymol Biru dalam medium dari warna hijau menjadi warna biru Persia gelap.

Selanjutnya, isolat ini bereaksi negatif terhadap reaksi yang menentukan ada atau tidaknya kemampuan untuk menghasilkan senyawa indol. Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa asam amino esensial triptofan di dalam medium, dengan bantuan katalisis enzim *tryptophanase* di dalam sel bakteri, akan mampu menghasilkan indol, yang dideteksi dengan adanya lapisan reagen berwarna merah *cherry* setelah penambahan reagen Kovac's. Akan tetapi, isolat ini tidak menghasilkan indol, karena tidak terjadinya reaksi hidrolisis triptofan dalam medium.

Dalam uji aktivitas enzim katalase, isolat ini bereaksi positif. Menurut Cappuccino & Sherman (2014), selama respirasi aerobik, mikroorganisme menghasilkan hidrogen peroksida dan dalam beberapa kasus, superoksida lain yang toksik bagi sel. Menurut Zhao & Drlica (2014), selain hidrogen peroksida dan superoksida, senyawa lain yang juga dikelompokkan ke dalam jenis senyawa *Reactive Oxygen Species* (ROS) ini adalah hidroksi radikal bebas. Lebih lanjut Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa substansi kimia tersebut dihasilkan ketika mikroorganisme aerobik, fakultatif anaerob, dan mikroaerofil menggunakan jalur respirasi aerobik, di mana oksigen merupakan

Tabel 3. Karakter Mikrobiologi Isolat EO-4 Dibandingkan dengan *Enterobacter* (berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*)

No.	Karakter	Hasil Uji	<i>Enterobacter</i> (dari referensi)
1.	Morfologi Koloni		
	- Bentuk	Oval	TD
	- Tepian	Entire	Entire
	- Elevasi	Datar	TD
	- Warna	Krem	TD
	- Pertumbuhan medium cair	Sedimen	Sedimen
2.	Morfologi Sel		
	- Gram, bentuk	- (negatif), batang pendek	- (negatif), batang pendek
3.	Aktivitas Biokimia		
	- Hidrolisis pati	-	-
	- Penggunaan sitrat	+	+
	- Produksi indol	-	-
	- Enzim katalase	+	-
	- Fermentasi karbohidrat		
	a. Sukrosa	+ (AG)	+
	b. Dekstrosa	+ (AG)	+
	c. Laktosa	+ (AG)	+
4.	Variasi Suhu Pertumbuhan		
	a. 25°C	+	+
	b. 37°C	+	+
	c. 47°C	+	TD
5.	Variasi pH Pertumbuhan		
	a. 3	-	-
	b. 5	+	+
	c. 7	+	+
	d. 9	+	+
6.	Variasi Salinitas Pertumbuhan		
	a. 0,85 %	+	+
	b. 5 %	+	-
	c. 10 %	-	-
	d. 15 %	-	-
7.	Ketersediaan Oksigen Bebas		
	a. Dengan O ₂	+	+
	b. Tanpa O ₂	+	+

Keterangan :

a. Tanda + menunjukkan hasil uji yang positif

b. Tanda - menunjukkan hasil uji yang negatif

c. Tanda AG menunjukkan produksi asam dan gas

Tanda TD menunjukkan bahwa uji tersebut tidak dibedakan

penerima elektron terakhir, ketika terjadi reaksi degradasi karbohidrat untuk menghasilkan energi. Organisme yang menghasilkan enzim katalase mampu secara cepat mendegradasi hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air (H₂O) dan oksigen (O₂) (Cappuccino & Sherman, 2014).

Dalam uji fermentasi karbohidrat, yang menggunakan sumber karbohidrat sukrosa, dekstrosa, dan laktosa, isolat yang diteliti mampu menggunakan sumber karbon tersebut sebagai substrat fermentasi, dan dihasilkan produk berupa asam dan gas, pada semua uji yang dilakukan. Menurut Cappuccino & Sherman (2014), dalam proses fermentasi, substrat seperti karbohidrat dan alkohol akan mengalami dissimilasi anaerob dan menghasilkan asam organik (seperti asam laktat, asam format, dan asam asetat), yang dapat diikuti dengan pembentukan gas seperti hidrogen atau karbondioksida. Proses fermentasi paling mudah dideskripsikan dengan degradasi glukosa melalui jalur Embden-Meyerhof, yang juga disebut dengan jalur glikolitik (Cappuccino & Sherman, 2014).

Pengaruh faktor lingkungan yang diteliti pada isolat potensial ini, salah satunya berupa suhu. Suhu

dan pH merupakan dua aspek yang mempengaruhi kinerja enzim dalam sel (Robinson, 2015). Lebih lanjut Robinson (2015) menuliskan bahwa pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim sangat kompleks, dan dapat dipandang sebagai dua aspek yang bertindak secara simultan, namun berada dalam arah yang berbeda. Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa suhu yang rendah dapat memperlambat atau menghambat aktivitas enzim, sehingga menghambat metabolisme sel, dan berdampak pada penghambatan pertumbuhan sel, sedangkan suhu yang tinggi dapat mengakibatkan proses denaturasi enzim-enzim yang termolabil. Lebih lanjut Cappuccino & Sherman (2014) menuliskan bahwa mikroorganisme mampu tumbuh pada jangkauan suhu yang lebar, akan tetapi, suhu optimum yang umum digunakan untuk kultur sebagian besar mikroba adalah pada 37°C selama periode 18 hingga 24 jam.

Selanjutnya, isolat yang diteliti tidak mampu tumbuh pada pH 3. Derajat keasaman juga sama seperti suhu, mampu mempengaruhi aktivitas enzim (Cappuccino & Sherman, 2014). Lebih lanjut Cappuccino & Sherman (2014) juga menuliskan bahwa umumnya, pH optimum untuk reaksi

metabolisme adalah pH netral 7, sehingga, penurunan dan peningkatan pH (pada kondisi asam dan basa) akan menurunkan laju reaksi kimia karena adanya kerusakan enzim seluler, dan lebih jauh lagi, mempengaruhi tingkat pertumbuhan dan daya tahan sel.

Pengujian variasi konsentrasi kadar garam terhadap kultur sel menunjukkan bahwa isolat yang diteliti tidak mampu tumbuh pada konsentrasi kadar garam 10% dan 15%. Kadar garam yang tinggi dalam medium dapat memberikan tekanan osmotik bagi sel karena kondisi hipertonik di luar sel (Cappuccino & Sherman, 2014). Garam, khususnya dalam bentuk NaCl, dapat menginduksi adanya kontraksi pada dinding sel bakteri gram negatif, dan hal ini berkaitan erat dengan pembengkakan sel dan plasmolisis yang dapat diamati secara keseluruhan pada sel (Marquis, 1968).

Faktor lingkungan lain yang diteliti adalah pengaruh ada dan tidaknya oksigen terhadap pertumbuhan sel isolat bakteri yang diteliti. Isolat bereaksi positif terhadap kondisi ada dan tidak adanya oksigen. Menurut Cappuccino & Sherman (2014), oksigen atmosferik berperan penting dalam pembentukan ATP dan ketersediaan energi dalam bentuk yang dapat digunakan untuk aktivitas sel, dengan menggunakan mekanisme reaksi respirasi aerobik. Akan tetapi, ketika berada dalam kondisi tidak ada oksigen (anaerob), sel menggunakan jalur lain untuk menghasilkan energi, yakni mekanisme respirasi anaerobik atau fermentasi (alkohol dan asam laktat) (Cappuccino & Sherman, 2014).

Karakter rhizobakteri pelarut fosfat berdasarkan beberapa uji yang telah dilakukan menunjukkan bahwa isolat EO-4 yang diperoleh memiliki karakter yang mirip dengan genus *Enterobacter* (berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*). Genus *Enterobacter* (khususnya *Enterobacter aerogenes*, *E.tay/orae* dan *E.asburiae*) merupakan jenis rhizobakteri pelarut fosfat yang berhasil diisolasi oleh Sahoo & Dahl (2009) dari ekosistem mangrove di Meksiko, selain *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Xanthobacter agilis*, *Vibrio proteolyticus*, *Kluyvera cryocrescens*, *B.licheniformis*, *Chryseomonas luteola* dan *Pseudomonas stutzeri*.

4. Kesimpulan

Isolat rhizobakteri pelarut fosfat potensial yang diisolasi dari tanah rhizosfer tumbuhan *Rhizophora* sp. di ekosistem mangrove Teluk Awur Kabupaten Jepara, dengan kode EO-4, menghasilkan indeks pelarutan fosfat sebesar 2,75. Karakter yang diteliti berupa morfologi koloni, morfologi sel, aktivitas biokimia, dan pengaruh faktor lingkungan terhadap pertumbuhan sel (suhu, pH, kadar garam, dan ketersediaan oksigen). Koloni sel isolat tersebut memiliki bentuk oval, tepian *entire*, elevasi datar, dan

warna krem. Sel bakteri ini merupakan bakteri gram negatif, dengan bentuk sel berupa batang pendek (*rod*). Isolat ini mampu menggunakan sitrat dalam medium uji dan menghasilkan enzim katalase, akan tetapi, tidak mampu menghidrolisis pati dalam medium dan tidak menghasilkan indol sebagai hasil reaksi hidrolisis asam amino triptofan dalam medium. Isolat ini juga mampu melakukan fermentasi karbohidrat berupa sukrosa, dekstosa, dan laktosa dalam medium, dan menghasilkan asam dan gas. Dilihat dari aspek faktor pertumbuhan yang diteliti, isolat ini mampu tumbuh pada suhu hingga 47°C, mampu tumbuh dengan ada maupun tidak adanya oksigen bebas, tidak mampu tumbuh pada pH 3, dan tidak mampu tumbuh pada kadar garam 10% dan 15%. Berdasarkan karakter-karakter tersebut, secara mikrobiologi dan atau aktivitas biokimia, isolat potensial pelarut fosfat ini diidentifikasi ke dalam genus *Enterobacter*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahemad, M & Khan, M.S., (2010), Plant Growth Promoting Activities of Phosphate Solubilizing *Enterobacter asburiae* as Influenced by Fungicides, *Eur. Asian Journal of Biosciences*, 4, 88-95.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C & Standing, D., (2010), Stress Induced Phosphate Solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from Tomato Rhizosphere, *Australian Journal of Crop Science*, 4(6), 378-383.
- Bariusso, J., Solano, B.R., Lucas, J.A., Lobo, A.P., Garcia-Villaraco, A & Manero, F.J.G., (2008), *Plant-Bacteria Interactions, Strategies and Techniques to Promote Plant Growth : Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L, (2002), *Biochemistry 5th Edition*, W H Freeman and Company, New York.
- Bharatkumar, S., Rameshkumar, N., Paul, D., Prabavaty, V.R & Sudha Nair., (2008), Characterization of the Predominant Bacterial Population of Different Mangrove Rhizosphere Soil Using 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP), *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 387-394.
- Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. & Zúñiga, D., (2010), Characterization of *Bacillus* Isolates of Potato Rhizosphere from Andean Soils of Peru and Their Potential PGPR Characteristics, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 899-906.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N., (1987), *Microbiology: A Laboratory Manual*, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California USA.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N., (2014), *Microbiology: A Laboratory Manual*, Pearson Education, United States of America.
- Carmo, F.L., Santos, H.F., Martins, E.F., Elsas, J.D., Rosado, A.S. & Peixoto, R.S., (2011), Bacterial Structure and Characterization of Plant Growth and Oil Degrading Bacteria from the Rhizosphere of Mangrove Plants, *The Journal of Microbiology*, 49(4), 535-543.

- Channarayappa, Biradar, D.P., (2019), *Soil Basics, Management, and Rhizosphere Engineering for Sustainable Agriculture*. CRC Press, Florida, USA.
- Collins, M.E., (2003), *Soil Section : Key to Soil Orders in Florida. Florida Envirothon Study Sections University of Florida*, Florida, United States America.
- Dastager, S.G., Deepa, C.K., Puneet, S.C., Nautiyal, C.S & Pandey, A., (2009), Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Strain *Pantoea NII-186*. from Western Ghat Forest Soil, India, *Journal Compilation 2009 The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 49, 20-25.
- Dewi, I.R., (2007), *Makalah : Rhizobacteria Pendukung Pertumbuhan Tanaman Plant Growth Promotor Rhizobacteria*, Universitas Padjdjaran, Jatinangor
- Fachrul, M.F., (2007), *Metode Sampling Bioekologi*, Bumi Aksara, Jakarta
- Fardiaz, S., (1989), *Mikrobiologi Pangan*, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Ginting, R.C.B., Saraswati, R & Husen, E., (2005), 7. Mikroorganisme Pelarut Fosfat : Pupuk Organik & Pupuk Hayati, dalam *Pupuk Hayati dan Pupuk Organik*, ed Suriadikarta & Simanungkalit, hal. 141-158.
- Girish, K., Shrikant, B., Sunil, M & Manish, D., (2010), Exploring the Potential of *Pseudomonas* Species as a Phosphate Solubilizer, Plant Growth Promoter, Biocontrol Agent and Pesticide Degradator. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 40-44.
- Hariyono, (2007), *Status Lingkungan Hidup Daerah Kabupaten Jepara*, Dinas Lingkungan Hidup Pertambangan dan Energi. Jepara.
- Hodges, S.C., (tanpa tahun), *Soil Science Extension North Carolina University : Soil Fertility Basics*, NC Certified Crop Advisor Training, North Carolina University, North Carolina.
- Jha, B.K., Pragash, M.G., Cletus, J., Raman, G & Sakthivel, N., (2008), Simultaneous Phosphate Solubilization Potential and Antifungal Activity of New Fluorescent *Pseudomonas* Strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. Mosselii*, *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 573-581.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P, Klironomos, J.N., Lee, H & Trevors, J.T., (2004), Review : Methods of Studying Soil Microbial Diversity, *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169- 188.
- Kothamasi, D., Kothamasi, S., Bhattacharyya, A., Kuhad, R.C. & Babu, C.R., (2006), Arbuscular Mycorrhizae and Phosphate Solubilizing Bacteria of the Rhizosphere of the Mangrove Ecosystem of Great Nicobar Island, India, *Biol Fertil Soils*, 42, 358-361.
- Krull, E.S., Skjemstad, J.O & Baldock, J.A., (2005), *GRDC Project No. CSO 00029 Residue Management, Soil Organic Carbon and Crop Performance: Functions of Soil Organic Matter and the Effect on Soil Properties*, CSIRO Land & Water PMB 2 Glen Osmond S.A 5064.
- Lee, K.D., Bai, Y., Smith, D., Han, H.S & Supanjani., (2005), Isolation of Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Bean Nodules, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3), 232-236.
- Marquis, R.E., (1968), Salt-Induced Contraction of Bacterial Cell Walls, *Journal of Bacteriology*, 95 (3), 775-781.
- Mehta, S & Nautiyal, C.S., (2001), An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria, *Current Microbiology*, 43, 51-56.
- Mishra, R.R., Dangar, T.K., Rath, B & Thatoi H, N., (2009), Characterization and Evaluation of Stress and Heavy Metal Tolerance of Some Predominant Gram Negative Halotolerant Bacteria From Mangrove Gills of Bhitarkanika, Orissa, India, *African Journal of Biotechnology*, 8(10), 2224-2231.
- Nisa', N.A., (2018), Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat dengan Sekuens 16S rRNA Asal Tanah Pertanian Organik Desa Sumberejo Batu. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Pangastuti, A., (2006), Review: Definisi Spesies Prokariota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein, *Biodiversitas*, 7 (3), 292- 296.
- Pritchard, D.L., (2005), Muresk Institute : Phosphorus Bioavailability from Land-Applied Biosolids in South-Western Australia, *Thesis*, Curtin University of Technology, Australia.
- Ramesh, V., Wani, S.P., Rego, T.J., Sharma, K.L., Bhattacharyya, T., Sahrawat, K.L., Padmaja, K.V., Gangadhar Rao, D., Venkateswarlu, B., Vanaja, M., Manna, M.C., Sanvas, K & Maruthi, V., (2007), *Chemical Characterization of Selected Benchmark Spots for C Sequestration in the Semi-Arid Tropics, India*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. India.
- Robinson, P.K., 2015. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem*, 59, 1-41.
- Rodríguez, H., & Fraga, R., (1999), Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. *Biotechnology Advances of Cuban Research Institute*, 17, 319-339.
- Sahoo, K & Dahl, N.K., (2009), Potential Microbial Diversity in Mangrove Ecosystems: A Review, *Indian Journal of Marine Sciences*, 38(2), 249-256.
- Sudha Nair, Sasirekha, N., Appunu, C., Bharathkumar, S., Loganathan, P., Rameshkumar, N., Sridhar, R., Subathra, G & Prabhavathy, V.R., (2008), *Microbial Diversity in Mangrove Ecosystem*. M.S. Swaminathan Research Foundation 3rd Cross Road, Taramani Institutional Area, Chennai-600113. National Institute of Agricultural Sciences and Technology, Suwon, South Korea & Medical Entomology, Dept. of Entomology, N. C. State University, Raleigh.
- Suwanto, A., (1994), Ulas Balik: Evolusi Mikrobe dan Kaitannya dengan Sistematis Molekuler, *Hayati*, 1 (2), 26-31.
- Thuller, D.S., Floh, E.I.S., Handro, W & Barbosa, H.R., (2003), Plant Growth Regulator and Amino Acids Released by *Azospirillum* sp. in Chemically Defined Media, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 174-178.
- Waluyo, L., (2008), *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.
- Zhao, X. & Drlica, K., (2014), Reactive Oxygen Species and The Bacterial Response to Lethal Stress, *Curr Opin Microbiol*, 21, 1-6.