

MIX CULTURE INOCULANT PRODUCTION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING AND INDOLE ACETIC ACID (IAA) PRODUCER RHIZOBACTERIA WITH AMBARAWA PEAT SOIL RAWAPENING AS CARRIER

Budi Raharjo, Agung Suprihadi

Microbiology Laboratory Biology Department of Mathematics and Natural Sciences Faculty, Diponegoro University. Prof. Soedarto, SH street Tembalang-Semarang 50275 email: budi206@yahoo.com

ABSTRACT---Plant production development is the main goals that do for increase the farming quality to fulfill the man needed in food. One of the ways is intensive farming, by using organic or inorganic fertilizer. Phosphate is the essential for plants. IAA is the necessary plant regulator for the root. Both phosphate and IAA need in plant growing and production. Biological fertilizer is fertilizer with microbial as the main material. *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.7, *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.3, *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.2b and *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum* sp and *Azotobacter brasilensis* are bacteria that can solubilization the phosphate and IAA synthesize. Those bacteria can be used as inoculants or biological fertilizer that put on carrier. One way to support the aim is giving the alternative carrier with suitable composition. The carrier should be support bacterial life during the storage. The aim of this research is find the right consortia, so can be used to optimized viabilities of culture *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.7, *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.3, *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.2b, *P. fluorescens*, *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *Azospirillum* sp., and *A. brasilensis* in mix culture on peat soil as carrier. This research done in Microbiology Laboratory of Biology Department Diponegoro University. Subculture and activated culture in Nutrient Broth medium, make the growth curve to the biomass production, make the inoculums, prepare the peat soil, biomass production and mixed biomass with the carrier, enumeration bacterial culture viability test in carrier during the storage by TPC method. The results show that all consortia culture bacteria viability *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.3 with *Azospirillum* (A) and *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.7, with *P. fluorescens* (B) still viable and increasing number of population during seven weeks storage with 10^{8-9} CFU/g at T_0 and up to 10^{13-14} CFU/g at the end storage. The consortium C between *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.2 b and *A. brasilensis* increasing the number of population and still viable during eight weeks storage ($10^{13} - 10^{14}$ CFU/g).

Key words: biofertilizer, peat soil, viability, mix culture, consortium

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Tanah masam mempunyai karakteristik pH yang rendah yaitu pada tanah masam kuat (5,5-4,5) sampai pada tanah yang ekstrim masam (< 4,5), kemampuan tukar kation rendah dan kejenuhan basa rendah [1]. Reaksi tanah yang masam itu disebabkan oleh curah hujan yang tinggi yang mengakibatkan basa-basa mudah tercuci [1]. Pengelolaan tanah-tanah mineral masam untuk kepentingan pertanian menghadapi kendala pH yang rendah, keracunan Al, Mn, dan/atau Fe, serta kekahatan unsur-unsur hara penting seperti N, P, Ca, dan atau Mg dan Mo [2]).

Gambut merupakan tanah yang terbentuk dari bahan organik pada fisiografi cekungan atau rawa, akumulasi bahan organik pada kondisi jenuh air, anaerob, menyebabkan

proses perombakan bahan organik berjalan sangat lambat, sehingga terjadi akumulasi bahan organik yang membentuk tanah gambut [3]). Secara teoritis permasalahan pertanian lahan gambut sesungguhnya disebabkan oleh drainase yang jelek, kemasaman gambut tinggi, tingkat kesuburan dan kerapatan lindak gambut yang rendah. Kemasaman gambut yang tinggi dan ketersediaan hara serta kejenuhan basa (KB) yang rendah menyebabkan produksi pertanian di lahan gambut sangat rendah. Pemanfatan kapur pertanian, dolomit, untuk memperbaiki kemasaman tanah dan KB memerlukan input dolomit yang tinggi dan mahal [3].

Upaya untuk mengatasi persoalan kesuburan tanah-tanah masam adalah dengan mengkombinasikan antara praktek usaha tani dengan penerapan bioteknologi tanah yang

menekankan pada komponen mengamankan suplai N di dalam sistem tanah-tanaman dengan pengayaan fiksasi N_2 dan pelarutan fosfat secara biologis [2]. pH tanah yang masam berpengaruh nyata terhadap kelarutan dari nutrisi tanaman dan mikroorganisme [1]. pH rendah menyebabkan terlepasnya Al^{3+} kedalam larutan tanah ([1]. Varietas tanaman yang diadaptasikan pada tanah masam membutuhkan pupuk N dalam jumlah yang besar, namun pemberian pupuk buatan yang biasa dilakukan petani cenderung tidak efisien karena sebagian besar nitrogen akan hilang melalui proses pencucian [1].

Kesadaran manusia akan pentingnya suatu peningkatan di bidang pertanian yang berkelanjutan dan ramah lingkungan mendorong manusia beralih pada pertanian menggunakan bahan-bahan organik atau lebih dikenal sebagai pertanian organik yang selaras dengan alam dan membentuk suatu aliran siklik dan seimbang dalam areal pertanian. Salah satu upaya yang dilakukan adalah memanfaatkan beberapa mikroorganisme yang dapat membantu penyediaan hara dan pengendalian penyakit sehingga diperoleh pertumbuhan, produksi, dan hasil panen yang lebih sehat [4].

Pembuatan konsorsium merupakan salah satu upaya yang sekarang digalakkan untuk penyediaan unsur hara dalam tanah yang lebih lengkap dan melimpah. Konsorsium-konsorsium ini mempunyai keselaran yang tinggi antar mikroba dan lingkungan. Keselarasan ini ditunjukkan dengan degradasi bahan organik dan fiksasi bahan anorganik menjadi mineral-mineral yang dibutuhkan oleh tanaman maupun mikroba itu sendiri dalam pertumbuhan dan perkembangannya.

Penelitian ini akan menganalisis konsorsium yang digunakan berupa bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik (*Azotobacter*) yang mampu menambat N_2 dari udara dan mengubahnya menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman dan bakteri pelarut fosfat (BPF) yaitu *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.7. BPF mampu mensintesis enzim phytase [5] dan fosfatase [5]), yang berperan dalam hidrolisis P organik (Martinez and Martinez, 2003 dalam

Widyati, 2007). Untuk melarutkan P anorganik BPF menghasilkan asam-asam organik yang membantu melepaskan P dalam tanah maupun yang terfiksasi dalam logam sehingga ketika konsorsium ini diinokulasikan atau diaplikasikan ke dalam rhizosfir mereka dapat memberikan dampak positif (*mutualisme* atau *komensalisme*) [5]

Biofertilizer

Pupuk hayati dapat didefinisikan sebagai preparasi yang mengandung sel-sel dari strain-strain efektif mikroba penambat nitrogen, pelarut fosfat atau selulolitik yang digunakan pada biji, tanah atau tempat pengomposan dengan tujuan meningkatkan jumlah mikroba tersebut dan mempercepat proses mikrobial tertentu untuk menambah banyak ketersediaan hara dalam bentuk tersedia yang dapat diasimilasi tanaman [6].

Pupuk hayati dikenal para petani sejak proyek intensifikasi kedelai pada tahun 1980-an. Namun, sejak Revolusi Hijau petani mulai banyak menggunakan pupuk buatan karena praktis penggunaannya dan sebagian besar varietas unggul memang membutuhkan hara makro (NPK) yang tinggi dan harus cepat tersedia. Dicabutnya subsidi pupuk dan tumbuhnya kesadaran terhadap dampak lingkungan yang dapat disebabkan pupuk buatan, membangkitkan kembali perhatian para petani terhadap penggunaan pupuk hayati [7].

Penggunaan pupuk hayati sangat bermanfaat bagi peningkatan produksi pertanian baik kualitas maupun kuantitas, mengurangi pencemaran lingkungan, dan meningkatkan kualitas lahan secara berkelanjutan. Penggunaan pupuk hayati dalam jangka panjang dapat meningkatkan produktivitas lahan dan dapat mencegah degradasi lahan [7].

Pertanian konvensional yang telah dipraktekkan di Indonesia sejak Revolusi Hijau banyak mempengaruhi keberadaan berbagai mikroba berguna dalam tanah. Mikroba-mikroba ini mempunyai peranan penting dalam membantu tersedianya berbagai hara yang berguna bagi tanaman. Praktek

inokulasi merupakan suatu cara untuk memberikan atau menambahkan berbagai mikroba pupuk hayati hasil skrining yang lebih unggul ke dalam tanah [7]

Dewasa ini orang sering berbicara tentang pupuk alternatif setelah harga pupuk kimia makin mahal. Pupuk alternatif sering diidentikkan dengan pupuk hayati dan pupuk organik. Penggunaan kata "alternatif" sebenarnya tidak tepat karena dapat memberikan pengertian yang keliru. Kata ini berarti memilih salah satu dari dua atau lebih pilihan. Dengan penafsiran seperti itu tidak heran alau akhir-akhir ini kita sering mendengar pernyataan seakan-akan pupuk hayati dapat menggantikan pupuk kimia, sehingga tidak perlu lagi menggunakan pupuk kimia kalau memang terlalu mahal untuk dibeli, cukup membeli pupuk hayati yang dianggap murah [8]. Pupuk hayati ini berasal dari bahan-bahan organik yang diinokulasi dengan mikroba yang berguna, sehingga mikroba ini dapat mengolah bahan-bahan organik tadi menjadi bahan anorganik yang berguna bagi tanaman.

Mikroba pelarut fosfat merupakan kelompok mikroba yang dapat mengubah fosfat tidak larut dalam tanah menjadi bentuk yang dapat larut dengan jalan mensekresikan asam organik seperti asam format, asetat, propionat, laktat, glikolat, fumarat, dan suksinat [6].

Mikroba yang tergolong kelompok ini dapat berupa bakteri (*Bacillus*, *Pseudomonas*), jamur (*Aspergillus*, *Penicillium*), dan aktinomiset (*Streptomyces*) [8]. Penelitian terdahulu telah mendapatkan isolat genus *Bacillus* yang teruji dapat melarutkan fosfat yang diperoleh dari tanah gambut di daerah Rawapening Ambarawa [9].

Lahan gambut merupakan deposit karbon, seperti halnya minyak bumi dan batubara. Jika dipelajari proses evolusi pembentukannya, deposit batubara senantiasa dimulai dari proses pembentukan gambut (*peat*) terlebih dahulu, kemudian deposit gambut mengalami deposisi bahan baru diatas gambut dan gambut selanjutnya mengalami kompresi membentuk batubara muda (*lignite*)

dan kompresi lanjut dari batubara muda ini akan membentuk batubara /*ant rachite* [10].

Lahan gambut merupakan suatu ekosistem yang unik dan rapuh, karena lahan ini berada dalam suatu lingkungan rawa, yang terletak di belakang tanggul sungai (*backswamp*). Oleh karena dalam lingkungan rawa, maka lahan ini senantiasa tergenang dan tanah yang terbentuk pada umumnya merupakan tanah yang belum mengalami perkembangan, seperti tanah-tanah aluvial (*Entisols*) dan tanah-tanah yang berkembang dari tumpukan bahan organik, yang lebih dikenal sebagai tanah gambut atau tanah organik /*Histosols* [10].

Gambut terbentuk dari seresah organik yang terdekomposisi secara anaerobik dimana laju penambahan bahan organik lebih tinggi daripada laju dekomposisinya. Gambut tropis umumnya berwarna coklat kemerahan hingga coklat tua (gelap) tergantung tahapan dekomposisinya. Kandungan air yang tinggi dan kapasitas memegang air 15-30 kali dari berat kering, rendahnya *bulk density* (0.05-0,4 g/cm³) dan porositas total diantara 75-95% menyebabkan terbatasnya penggunaan mesin-mesin pertanian dan pemilihan komoditas yang akan diusahakan [11].

Ketebalan horison organik, sifat *subsoil* dan frekuensi luapan air sungai mempengaruhi komposisi kimia gambut. Pada tanah gambut yang sering mendapat luapan, semakin banyak kandungan mineral tanah sehingga relatif lebih subur. Tanah gambut tropis mempunyai kandungan mineral yang rendah dengan kandungan bahan organik lebih dari 90%. Secara kimiawi gambut bereaksi masam (pH di bawah 4) [12]. Gambut dangkal pH lebih tinggi (4,0-5,1), gambut dalam (3,1-3,9). Kandungan N total tinggi tetapi tidak tersedia bagi tanaman karena rasio C/N yang tinggi. Kandungan unsur mikro khususnya Cu, B dan Zn sangat rendah [13].

Di Malaysia, pH gambut berkisar antara 3,2 – 4,9 sedangkan di pantai timur Sumatera berkisar 3,42 – 4,3. Gambut yang berkembang disepanjang pantai timur Sumatera mempunyai sifat-sifat : gambut

dalam (lebih dari 4 m) dengan status hara kahat N, P, K, Mg, Ca, Zn dan B berada dalam keadaan cukup, sedangkan faktor pembatas utama pada lahan gambut adalah tidak tersedianya unsur Cu bagi tanaman [14]

TINJAUAN PUSTAKA

Pupuk Hayati

Pupuk hayati merupakan mikroba hidup yang diberikan ke dalam tanah sebagai inokulan untuk membantu tanaman memfasilitasi atau menyediakan unsur hara tertentu bagi tanaman. Pupuk hayati sering juga disebut pupuk mikroba [8].

Tabel 2.1. Pupuk hayati komersial di Indonesia dan kandungan mikroorganismenya [8]

| Nama produk pupuk hayati | Kandungan mikroorganismenya |
|--|---|
| Legin Rhizo-plus | Rhizobia <i>Rhizopulus Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Bacillus, Micrococcu</i> |
| Emas | <i>Azospirillum, Azotobacter, Beijerinckia, Aeromonas punctata, Aspergillus niger</i> |
| Ginon 100x Biofer 2000-K Biofer 2000-N | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> Jamur endomikoriza Jamur ektomikoriza |

Mikroorganisme yang digunakan dalam pupuk hayati dalam bentuk inokulan dapat mengandung hanya satu strain tertentu atau monostain, tetapi dapat pula mengandung lebih dari satu strain atau multistain. Strain-strain pada inokulan multistain dapat berasal dari satu kelompok inokulasi silang (*cross-inoculation*) atau lebih. Awalnya hanya dikenal inokulan yang hanya mengandung satu kelompok fungsional mikroba (pupuk hayati), tetapi perkembangan teknologi telah memungkinkan memproduksi inokulan yang mengandung lebih dari satu kelompok fungsional mikroba [8].

Inokulan-inokulan komersial saat ini mengandung lebih dari satu strain atau lebih dari satu kelompok fungsional mikroba [7]).

Contoh dari pupuk hayati multistain adalah Rhizo-plus yang mengandung bakteri penambat nitrogen (*Bradyrhizobium* dan *inorhizobium*) dan bakteri pelarut fosfat (*Bacillus* dan *Micrococcus*) [8].

Mikroba Pelarut Fosfat

Bakteri seperti genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* serta fungi seperti genus *Penicillium* dan *Aspergillus* berperan dalam transformasi fosfat tidak terlarut dengan bantuan asam organik seperti asam format, asetat, propionat, laktat, dan glikonat, fumarat dan suksinat yang dikeluarkannya. Penurunan pH yang diciptakan oleh sekresi asam organik membantu pelarutan bentuk ikatan fosfat [6]

Menurut [15] dan [16], mikroba pelarut fosfat berperan dalam proses transformasi unsur P dengan cara :

1. Mengubah kelarutan senyawa fosfat anorganik
2. Meningkatkan mineralisasi senyawa organik dengan melepaskan fosfat anorganik
3. Mendorong proses oksidasi dan reduksi senyawa fosfat anorganik.

Pertumbuhan mikroorganisme membutuhkan fosfor yang penting untuk pembentukan sel. Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh ketersediaan senyawa fosfor siap pakai dalam habitatnya. Defisiensi tidak dijumpai secara nyata meskipun mikroorganisme itu terinduksi secara artifisial dengan penambahan karbohidrat. Perubahan fosfat memberi sedikit efek pada mikroflora setelah ditemukannya mobilisasi yang efisien dalam jumlah besar dari persediaan alami elemen fosfor [17].

Bacillus sp. DUCC-BR-K1.3, Bacillus sp. DUCC-BR-K1.7, Bacillus sp. DUCC-BR-K1.2 b

Menurut Raharjo (2004) bakteri secara makroskopis membentuk koloni berwarna putih krem, secara mikroskopis sel berbentuk batang, tersusun streptobasil, dan termasuk gram positif. Spora berbentuk oval dan terletak sentral. Berdasarkan uji biokimia, isolat ini menunjukkan kemampuan produksi asam dalam fermentasi glukosa, tidak tahan asam, memproduksi indol, mengubah indikator metal merah menjadi merah oleh asam yang diporduksinya, kemampuan menghasilkan asetil-metil karbinol dari asam organik hasil fermentasi karbohidrat, tidak dapat menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, produksi katalase, mampu menghidrolisis gelatin, produksi amilase (hidrolisis amilum). Semua ciri tersebut menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan *Bacillus sp. DUCC-BR-K1.3*.

Rhizosfer

Rhizosfer adalah suatu lingkungan di dalam tanah yang terbentuk dan dipengaruhi oleh adanya perakaran suatu tanaman. Pengaruh perakaran tanaman ini meliputi bahan-bahan hasil eksudasi akar dan mikroklinat. Pengaruh perakaran ini menyebabkan bervariasinya mikroba yang berada pada rhizosfer suatu tanaman. Senyawa yang terkandung dalam eksudat (hasil eksudasi) akar tanaman pada umumnya adalah senyawa-senyawa organik meliputi asam-asam organik, asam amino, vitamin dan senyawa metabolit tanaman [18]; [19].

Mikroba Pengikat Nitrogen

Penambatan N₂ dapat terjadi secara simbiotik, nonsimbiotik, dan kimia. Nitrogenase adalah enzim utama dalam penambatan N₂ udara secara biologi. Aktivitas enzim memerlukan ATP, feredoksin, pereduksi dan sitokrom. Penambatan N₂ terbesar dalam lingkungan tanah dilakukan oleh bakteri *Rhizobium*, yaitu bakteri yang bersimbiosis dalam perakaran legum. Penambat N yang hidup beba, misalnya *Azotobacter* [18].

Selain *Azotobacter*, bakteri lain yang dapat menambat N₂ udara adalah spesies-spesies *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Clostridium*, *Azospirillum*, dan *Thiobacillus* [18].

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Viabilitas Bakteri

a. Nutrient

Mikroba sama dengan makhluk hidup lainnya, memerlukan nutrient sebagai sumber energi dan pertumbuhan selnya. Unsur-unsur dasar tersebut antara lain karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, sulfur, fosfor, zat besi dan sejumlah kecil logam lainnya. Ketiadaan atau kekurangan sumber-sumber nutrisi ini dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba hingga pada akhirnya dapat menyebabkan kematian [20].

b. Air

Bakteri terdiri dari 70 – 80 % air. Semua mikroba membutuhkan air untuk pertumbuhan dan reproduksi, apabila tidak terdapat air, bakteri mungkin dapat bertahan dalam status metabolisme inaktif dalam waktu yang cukup panjang. Air merupakan penyusun sebagian besar sitoplasma sel, dan sebagian besar reaksi enzimatik juga terjadi pada larutan cair ini, seperti transport bahan dari dalam dan keluar sel. Dalam pembuatan media yang digunakan adalah akuades, karena air mengandung bahan anorganik dalam jumlah yang tidak tentu [21]

c. Aerasi

Aerasi ditentukan oleh porositas dan kandungan air dalam media pembawa, apabila aerasi terhambat, maka akan terjadi proses anaerob yang akan menghasilkan bau yang tidak sedap [22]

d. Suhu

Semua proses pertumbuhan bergantung pada reaksi kimiawi dan laju reaksi-reaksi ini dipengaruhi oleh suhu. Pola pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu. Suhu juga mempengaruhi laju pertumbuhan dan jumlah total pertumbuhan organisme [20].

e. Keasaman atau kebasaaan (pH)

Keasaman atau kebasaaan (pH) optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri terletak antara 6,5 dan 7,5, namun beberapa spesies dapat tumbuh dalam keadaan sangat asam atau sangat alkalin. Bagi kebanyakan spesies, nilai pH minimum dan maksimum ialah antara 4 dan [23].

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Bahan dan alat

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas kimia, tabung reaksi, jarum ose, lampu spiritus, inkubator, autoklaf, oven, mikroskop, pipet

ukur, pipet tetes, neraca "sartorius" atau "ohaus", batang pengaduk, mikropipet, tip, gelas ukur, rotary shaker, saringan 30 Mesh, hot plate, botol selai, ani-ani, tupperware, rak tabung reaksi.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan terdiri dari *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b, *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7, bakteri *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum* sp dan *Azotobacter brasilensis*, sampel tanah gambut Rawa Pening, tanah dari rhizosfer tanaman medium *Nutrient Broth* (NB), medium *Nutrient Agar* (NA), Medium YEMA, Media untuk uji-uji biokimia, akuades, akuabides, CaCO₃, pH stick, alkohol, tisu, kapas, spiritus.

Cara Kerja

Persiapan media pembawa (tanah gambut dan batu apung)

Media pembawa yang sudah dikeringanginkan, disaring dengan saringan 30 mesh. Tanah gambut dan batu apung diukur pH-nya menggunakan pH stick, apabila pH menunjukkan asam maka ditambah dengan CaCO₃ sampai pH menunjukkan netral (pH 7). Kelembaban media pembawa dapat ditentukan dengan mengeringkan 25 g media pembawa pada suhu 100°C dalam oven selama 24 jam. Kapasitas lapang media pembawa dapat ditentukan dengan menambahkan air pada 25 g media pembawa kering oven sampai media pembawa dalam kondisi jenuh air atau mencapai kapasitas lapang. Media pembawa yang sudah jenuh air dibiarkan semalam dan kemudian ditimbang [24]

Tanah gambut dan batu apung yang akan digunakan harus dalam keadaan steril. Sebanyak 50 g media pembawa dimasukkan ke dalam botol dan diautoklaf sebanyak dua kali pada 121°C, 1 atm, selama 15-20 menit untuk mematikan kontaminan. Media pembawa yang sudah sterilkan dilembabkan dengan menggunakan akuabides steril sampai mencapai kapasitas lapang.

Pembuatan medium pertumbuhan (Nutrien Broth dan Nutrien Agar)

Medium pertumbuhan Nutrien Broth dibuat dengan memasukkan NB komersil ke dalam erlenmeyer sebanyak 8 gram untuk setiap 1000 mL sedangkan medium pertumbuhan, Nutrien Agar dibuat dengan memasukkan NA komersil sebanyak 23 gram untuk setiap 1000 mL. Larutan medium dipanaskan di atas penangas air hingga semua bahan larut homogen kemudian didinginkan. Larutan medium disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 1atm, selama 15-20 menit.

Isolasi Dan Pengkulturan *Azotobacter* sp. Dalam Media Pertumbuhan Buatan

Tanah diambil dari daerah rhizosfer tanaman, tanah dikering-anginkan lalu ditumbuk dan diayak hingga lolos mata saring 2 mm. Inokulasi medium cair dengan 2 gram tanah, Inokulasi pada 25°C sampai terbentuk pellicle pada permukaan medium, Jangan mengganggu pellicle yang baru tumbuh, Lakukan pewarnaan gram terhadap pellicle yang tertumpuk. Amati sel yang besar, Organism lain kadang tumbuh pada pellicle, Cairkan 2 tabung ashby's mannitol phosphate agar, Biarkan dingin sampai 50°C, Tuangkan agar ke dalam 2 cawan petri steril, Biarkan membeku, Goreskan 1 ose pellicle pada cawan petri I, Goreskan 1 ose yang tadi langsung pada petri II, Inkubasikan pada 25°C (1-3 minggu), Warnai dengan pengecatan gram setiap koloni yang terjadi dan amati. Koloni *Azotobacter* mempunyai ciri-ciri berbentuk *convex*, *smooth*, putih, *semiopaque*, *moist*, *viscid*, dengan diameter kurang lebih 4 - 8 mm. Isolat-isolat murni tersebut dipelihara dalam medium agar miring.

Peremajaan Dan Pemeliharaan Isolat

Isolat bakteri pelarut fosfat *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b, *Bacillus* sp DUCC.BR.K1.7 dan *Azotobacter* sp. sebagai kultur stok pertama ditumbuhkan pada medium Nutrien Agar dengan metode *streaking plate* (goresan agar) yang dibuat dua seri yaitu sebagai kultur stok kedua dan kultur kerja. Kultur stok pertama

dan kedua ini kemudian disimpan kembali pada suhu inkubasi 15°C [9]

Aktivasi Bakteri

Aktivasi *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b, *Bacillus coagulans* DUCC-BR-K1.7 dilakukan untuk mengkondisikan bakteri pada keadaan aktif yang sesuai pertumbuhannya. Aktivasi dilakukan dengan mengambil satu ose kultur bakteri hasil peremajaan lalu diinokulasikan ke dalam 50 ml NB dan diagitasi dengan *orbital shaker* 120 rpm selama 24 jam (Raharjo, 2004).

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b, *Bacillus coagulans* DUCC-BR-K1.7 dan *Azotobacter* sp. diukur melalui penghitungan jumlah koloni yang digunakan untuk mengetahui jumlah sel bakteri dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Penghitungan jumlah koloni yang tumbuh dilakukan dengan menggunakan *coloni counter*. Penghitungan dilakukan setiap 3 jam selama 36 jam.

Penumbuhan Kultur Kerja

Kultur kerja diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Kultur ini kemudian diinokulasi menggunakan jarum ose ke dalam erlenmeyer yang berisi 60 mL medium NB dan diinkubasi 24 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Sebanyak 20 mL kultur diambil menggunakan pipet ukur dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 150 mL medium NB kemudian diinkubasi kembali dengan *rotary shaker* sampai fase lag bakteri.

Inokulasi isolat *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7 dan *Azotobacter* sp.

Sebanyak 15 botol yang masing-masing botol berisi 50 gram media pembawa ditambahkan isolat *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7, *Azotobacter* sp., dan campuran kedua bakteri tersebut (konsorsium) sebanyak 15 mL dengan kepadatan bakteri sekitar 10⁸ sel/

mL. Selanjutnya dilakukan penghitungan total koloni bakteri menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Hasil dari penghitungan ini digunakan sebagai kontrol.

Penghitungan Total Koloni Bakteri

Suatu pengenceran bertingkat dibuat dengan kelipatan 1 : 10. Sebanyak 1 gram media pembawa yang telah diinokulasikan bakteri *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b, *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7 dan *Azotobacter* sp. dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril, dan disebut pengenceran 10⁻¹. Satu mili liter diambil dari pengenceran 10⁻¹ dan diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril dan disebut sebagai pengenceran 10⁻². Demikian seterusnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai pengenceran 10⁻⁹. Pada pengenceran 10⁻⁵ sampai 10⁻⁹ akuades steril diinokulasikan secara aseptik ke dalam cawan petri sebanyak 1 ml. dan dibuat duplo (dua kali pengulangan) pada pengenceran 10⁻⁶ sampai 10⁻⁸. Medium NA yang telah disterilkan dengan menggunakan autoklaf dicairkan dalam pemanas air dan didinginkan sampai pada suhu 40 °C, kemudian dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri dan digoyang-goyangkan agar tercampur merata dengan sampel. Campuran medium NA dengan sampel kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

Jumlah bakteri per ml sampel =

$$\frac{\text{jumlah koloni}}{\text{faktor pengenceran}}$$

Aplikasi Bakteri Pada Tanah Gambut

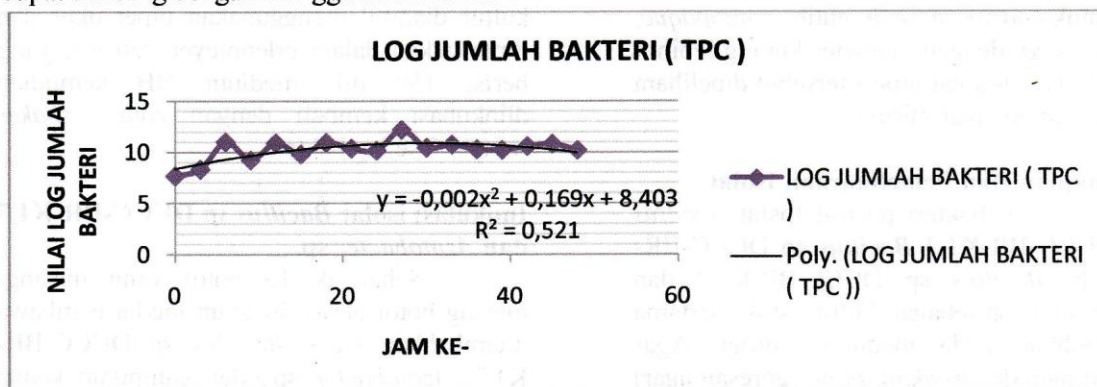
Percobaan ini dibuat dengan lima perlakuan perbandingan tanah gambut sebagai media pembawa bakteri *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b, *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7, *Azotobacter* sp., dan konsorsium dari kedua bakteri tersebut.

Uji viabilitas mikroba

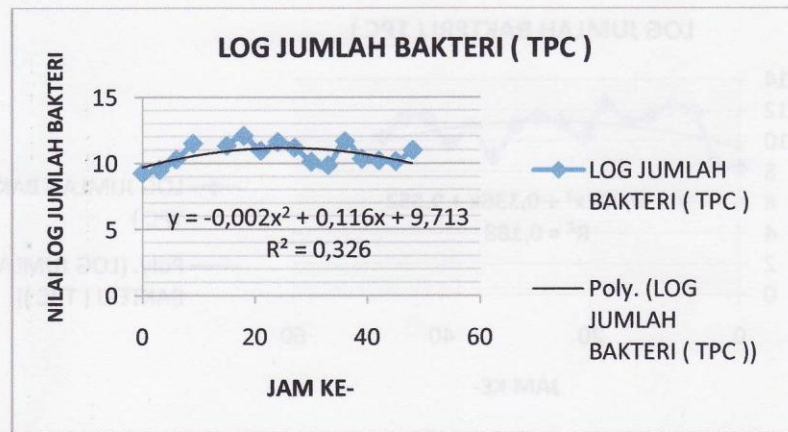
Uji kestabilan mikroba berdasarkan viabilitas dan jumlah populasi bakteri. Daya tumbuh (viabilitas) bakteri ditentukan dengan metode TPC (*Total Plate Count / Hitungan Lempeng Total*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

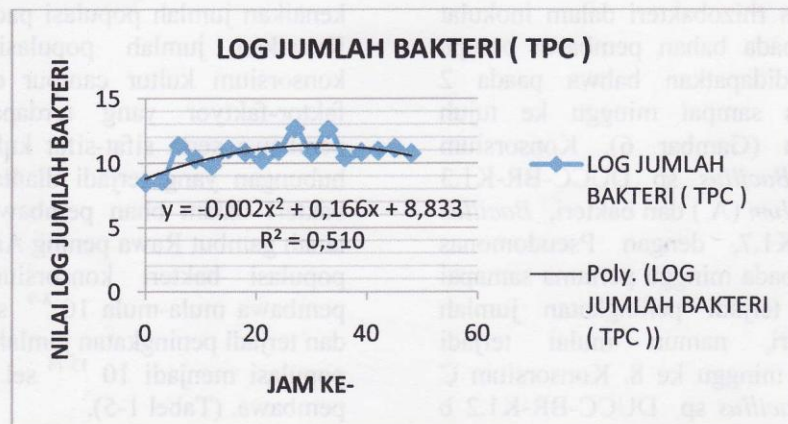
Kurva pertumbuhan bakteri *P.s fluorescens*, *A chroococcum*, *A. vinelandii*, *Azospirillum* sp dan *A. brazilensis* terlihat seperti pada Gambar 1, Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4 dan Gambar 5. Midlog tercepat dicapai oleh *Azospirillum*, diikuti oleh berturut-turut *P. flourescens*, *A.r vinelandii*, *A. brazilensis* dan *A. chroococcum*.



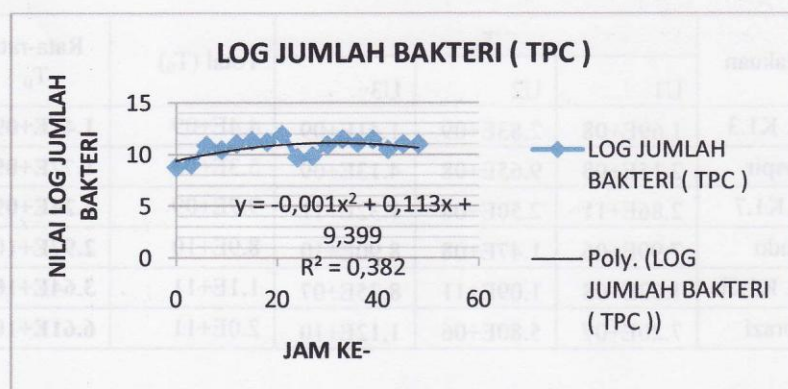
Gambar1. Kurva Pertumbuhan *P. flourescens* pada medium NB



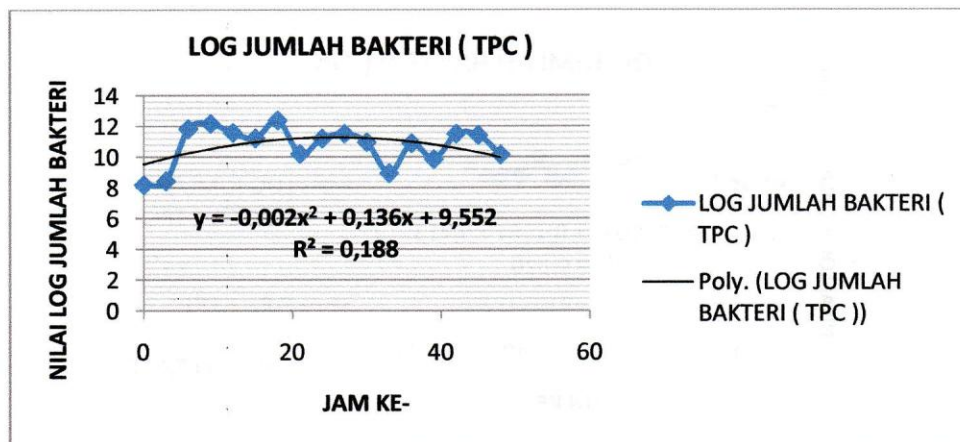
Gambar 2. Kurva Pertumbuhan *A. chroococcum* Berdasarkan TPC



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan *A. vinelandii* Berdasarkan Jumlah Sel Bakteri



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan *A. brasilensis* berdasarkan Jumlah Sel Bakteri



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan *Azospirillum* sp. berdasarkan Jumlah Sel Bakteri

Viabilitas rhizobakteri dalam inokulat kultur campur pada bahan pembawa berupa tanah gambut didapatkan, bahwa paada 2 minggu pertsms sampai minggu ke tujuh terjadi kenaikan (Gambar 6). Konsorsium antara bakteri *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 dengan *Azospirillum* (A) dan bakteri, *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7, dengan *Pseudomonas flourescens* (B) pada minggu pertama samapai minggu ke 7 terjadi peningkatan jumlah populasi bakteri, namun mulai terjadi penurunan pada minggu ke 8. Konsorsium C antara bakteri *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2 b dengan *Azotobacter brasilensis* terjadi

kenaikan jumlah populasi pada kedua bakteri. Kenaikan jumlah populasi bakteri pada konsorsium kultur campur dipengaruhi oleh faktor-faktyor yang terdapat pada bahan pembawa serta sifat-sifat kultur bakteri serta hubungan yang terjadi diantara kedua kultur bakteri dalam bhan pembawa dalam hal ini tanah gambut Rawa pening Ambarawa. Jumlah populasi bakteri konsorsium pada bahan pembawa mula-mula 10^{8-9} sel per gram (T_0) dan terjadi peningkatan jumlah populasi menjadi 10^{13-14} sel per gram bahan pembawa. (Tabel 1-5).

Tabel 1. Data viabilitas rhizobakteri dalam kultur campur (T_0)

| kelompok | Perlakuan | T_0 | | | Total (T_0) | Rata-rata T_0 | log rata-rata jumlah sel (T_0) |
|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------------|-----------------|------------------------------------|
| | | U1 | U2 | U3 | | | |
| A | B. K1.3 | 1.69E+08 | 2.83E+09 | 1.41E+09 | 4.4E+09 | 1.47E+09 | 9.17 |
| | Azospir | 2.15E+08 | 9.65E+08 | 4.13E+09 | 5.3E+09 | 1.77E+09 | 9.25 |
| B | B. K1.7 | 2.86E+11 | 2.50E+08 | 1.32E+11 | 9.7E+09 | 3.24E+09 | 9.51 |
| | pseudo | 7.90E+06 | 1.47E+08 | 8.90E+10 | 8.9E+10 | 2.97E+10 | 10.47 |
| C | B. K1.2b | 1.02E+08 | 1.09E+11 | 8.35E+07 | 1.1E+11 | 3.64E+10 | 10.56 |
| | A. brazi | 7.20E+07 | 5.80E+06 | 1.12E+10 | 2.0E+11 | 6.61E+10 | 10.82 |

Tabel 2. Data viabilitas rhizobakteri dalam kultur campur (T₁)

| kelompok | Perlakuan | T ₁ | | | Total (T ₁) | Rata-rata T ₁ | log rata-rata jumlah sel (T ₁) |
|----------|-----------|----------------|----------|----------|-------------------------|--------------------------|--|
| | | U1 | U2 | U3 | | | |
| A | B. K1.3 | 3.82E+11 | 8.60E+10 | 5.05E+12 | 5.5E+12 | 1.84E+12 | 12.26 |
| | Azospir | 1.63E+11 | 1.45E+10 | 3.00E+09 | 1.8E+11 | 6.02E+10 | 10.78 |
| B | B. K1.7 | 6.70E+09 | 2.69E+10 | 1.96E+11 | 2.3E+11 | 7.64E+10 | 10.88 |
| | pseudo | 1.00E+12 | 6.40E+09 | 2.30E+10 | 5.9E+12 | 1.98E+12 | 12.30 |
| C | B. K1.2b | 1.92E+10 | 3.74E+11 | 2.80E+09 | 4.0E+11 | 1.32E+11 | 11.12 |
| | A. brazi | 4.30E+09 | 9.20E+09 | 1.50E+09 | 1.5E+10 | 5.00E+09 | 9.70 |

Tabel 3. Data viabilitas rhizobakteri dalam kultur campur (T₂)

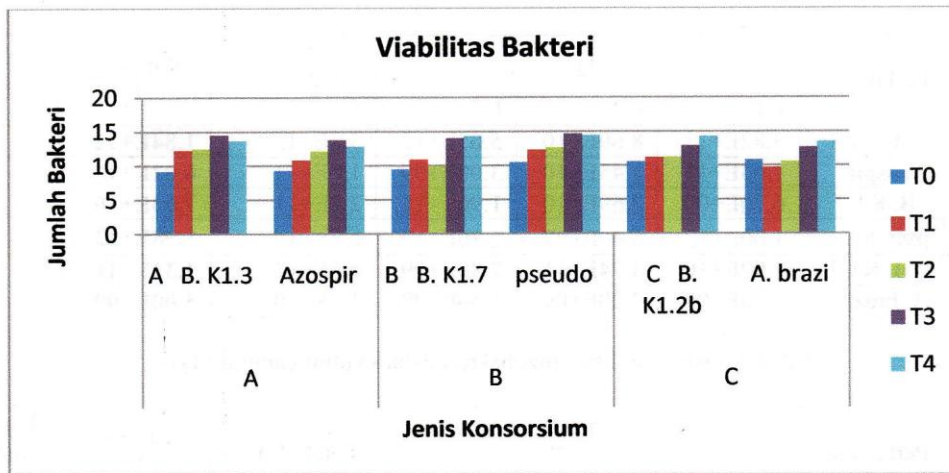
| kelompok | Perlakuan | T ₂ | | | Total (T ₂) | Rata-rata T ₂ | log rata-rata jumlah sel (T ₂) |
|----------|-----------|----------------|----------|----------|-------------------------|--------------------------|--|
| | | U1 | U2 | U3 | | | |
| A | B. K1.3 | 6.50E+09 | 7.00E+12 | 1.70E+12 | 8.7E+12 | 2.90E+12 | 12.46 |
| | Azospir | 1.30E+09 | 3.60E+12 | 2.56E+10 | 3.6E+12 | 1.21E+12 | 12.08 |
| B | B. K1.7 | 1.25E+10 | 3.90E+09 | 1.18E+10 | 2.8E+10 | 9.40E+09 | 9.97 |
| | pseudo | 3.00E+09 | 1.35E+10 | 2.40E+12 | 1.2E+13 | 4.12E+12 | 12.61 |
| C | B. K1.2b | 4.60E+11 | 5.10E+10 | 4.20E+09 | 5.2E+11 | 1.72E+11 | 11.23 |
| | A. brazi | 3.97E+10 | 1.73E+10 | 5.05E+10 | 1.1E+11 | 3.58E+10 | 10.55 |

Tabel 4. Data viabilitas rhizobakteri dalam kultur campur (T₃)

| kelompok | Perlakuan | T ₃ | | | Total (T ₃) | Rata-rata T ₃ | log rata-rata jumlah sel (T ₃) |
|----------|-----------|----------------|----------|----------|-------------------------|--------------------------|--|
| | | U1 | U2 | U3 | | | |
| A | B. K1.3 | 3.90E+10 | 9.75E+13 | 7.68E+14 | 8.7E+14 | 2.89E+14 | 14.46 |
| | Azospir | 3.08E+10 | 1.35E+13 | 1.51E+14 | 1.6E+14 | 5.48E+13 | 13.74 |
| B | B. K1.7 | 1.21E+10 | 2.40E+14 | 8.50E+13 | 3.3E+14 | 1.08E+14 | 14.03 |
| | pseudo | 3.20E+09 | 1.61E+14 | 6.50E+13 | 1.4E+15 | 4.52E+14 | 14.65 |
| C | B. K1.2b | 1.42E+10 | TBUD | 2.59E+13 | 2.6E+13 | 8.64E+12 | 12.94 |
| | A. brazi | 1.70E+10 | 9.70E+12 | 2.90E+12 | 1.3E+13 | 4.21E+12 | 12.62 |

Tabel 5. Data viabilitas rhizobakteri dalam kultur campur (T₄)

| kelompok | Perlakuan | T ₄ | | | Total (T ₄) | Rata-rata T ₄ | log rata-rata jumlah sel (T ₄) |
|----------|-----------|----------------|----------|----------|-------------------------|--------------------------|--|
| | | U1 | U2 | U3 | | | |
| A | B. K1.3 | 6.89E+13 | 7.10E+13 | 7.35E+12 | 1.5E+14 | 4.91E+13 | 13.69 |
| | Azospir | 1.50E+13 | 3.10E+12 | 4.20E+11 | 1.9E+13 | 6.17E+12 | 12.79 |
| B | B. K1.7 | 1.48E+13 | 5.68E+14 | 2.17E+12 | 5.8E+14 | 1.95E+14 | 14.29 |
| | pseudo | 3.45E+12 | 2.65E+11 | 5.95E+10 | 7.5E+14 | 2.50E+14 | 14.40 |
| C | B. K1.2b | 6.00E+10 | 4.92E+14 | 2.59E+13 | 5.2E+14 | 1.73E+14 | 14.24 |
| | A. brazi | 5.60E+09 | 8.05E+12 | 8.90E+13 | 9.7E+13 | 3.24E+13 | 13.51 |



Gambar 6. Kurva viabilitas rhizobakteri dalam kultur campur selama penyimpanan 60 hari (T₀-T₄)

SIMPULAN

Konsorsium antara bakteri *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 dengan *Azospirillum* (A) dan bakteri, *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.7, dengan *Pseudomonas fluorescens* (B) pada minggu pertama sampai minggu ke 7 terjadi peningkatan jumlah populasi bakteri, namun mulai terjadi penurunan pada minggu ke 8. Konsorsium C antara bakteri *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.2b dengan *Azotobacter brasilensis* terjadi kenaikan jumlah populasi pada kedua bakteri. Semua

konsorsium yang dicoba masih baik untuk digunakan sebagai inokulum (biofertilizer) setelah masa penyimpanan pada temperatur ruang ($\pm 28-30^{\circ}\text{C}$) dengan jumlah populasi bakteri 10^{13-14} sel per gram bahan pembawa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro, melalui Hibah Bersaing Progam DIPA 2009 yang telah memberikan dana bagi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Isminarni F., Sri W., Jaka W., Benito H. P., 2007. Penambatan Nitrogen Dan Penghasilan Indol Asam Asetat Oleh Isolat-Isolat *Azotobacter* Pada Ph Rendah Dan Aluminium Tinggi. Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* 7 (1): 23-30.
- [2] Wedhastri, S. 2002. Isolasi Dan Seleksi *Azotobacter* spp. Penghasil Faktor Tumbuh Dan Penambat Nitrogen Dari Tanah Masam. Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* 3 (1): 45-51.
- [3] Sagiman, S. 2007. Pemanfaatan Lahan Gambut dengan Perspektif Pertanian Berkelanjutan. Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Ilmu Kesuburan Tanah Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura. Pontianak
- [4] Rahmawati N. 2005. Pemanfaatan Biofertilizer Pada Pertanian Organic. USU Repository Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara. Medan.

- [5]Widyati E. 2007. Formulasi Inokulum Mikroba: MA, BPF dan Rhizobium Asal Lahan Bekas Tambang Batubara untuk Bibit *Acacia Crassiparva* Cunn. Ex-Benth Pusat Litbang Hutan dan Konservasi Alam, Bogor. *Jurnal B I O D I V E R S I T A S* 8: 238-241
- [6]Rao, Subba N. S. 1982. **Biofertilizer in Agriculture**. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi
- [7]Simanungkalit R.D.M., Didi A. S.a, Rasti S., Diah S., dan Wiwik H. 2006. Pupuk Organik Dan Pupuk Hayati (*Organic Fertilizer And Biofertilizer*), Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, bogor
- [9]Raharjo, B. 2004. **Penapisan Rhizobacteria Tahan Tembaga (Cu) dan mampu Mensintesis IAA dari Rizosfer Kedelai (*Glycine max*)**. ITB. Bandung.
- [10]Mulyanto B. dan Basuki S. 2002. *Pengelolaan Lahan Gambut secara Ekologis Untuk Kesejahteraan Masyarakat*. Center for Wetlands Studies Department of Soil Sciences – Faculty of Agriculture Bogor Agricultural University. Bogor
- [11]Ambak, K., & Melling, L., 2000. Management Practices for Sustainable Cultivation of Crop Plants on Tropical Peatlands. Proc. of The International Symposium on Tropical Peatland 22-23 November 1999. Bogor-Indonesia : 119
- [12]Andriese, 1988. *Nature and Management of Tropical Peat Soils*. FAO Soils Bulletin 59. Food and Agriculture Organisation of The United Nations. Roma
- [13]Subagyo, Marsoedi dan Karama, S., 1996. *Prospek Pengembangan Lahan Gambut untuk Pertanian dalam Seminar Pengembangan Teknologi Berwawasan Lingkungan untuk Pertanian pada Lahan Gambut*, 26 September 1996. Bogor
- [14]Sudradjat dan Qusairi, L., 1992. Diversifikasi Usaha Perkebunan Pada Lahan Gambut Dengan Kelapa Sebagai Tanaman Utama (Suatu Pandangan terhadap pemanfaatan Lahan Gambut). Seminar Pengembangan Terpadu
- [15]Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed. John Wiley and Sons. New York.
- [16]Gaur, A.C. 1986. **Phosphor Microorganisms and Various Transformation In: FAO (Ed.)**. Efficient Fertilizer Use in Acid Upland Soils of the Humid
- [17]Chapelle, F. H. 2001. *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. John Wiley and Sons. New York Isroi, 2005. *Bioteknologi Mikroba untuk Pertanian Organik*. Available at <http://www.ipardboo@ondo.net.id>. Selasa, 17 Mei 2005
- [18]Rao, N.S., Subba. 1994. *Mikroba Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. UI Press. Jakarta
- [19]Curl, E. A. and Truelove, B. 1986. **The Rhizosphere**. Springer-Verlag, Berlin.
- [20]Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang
- [21]Yulneriwarni. 2008. *Nutrisi Bakteri (Bakteriologi)*. <http://maliyuri.com>. 30 November 2008.
- [22]Anonim, 2008. *Pupuk Organik, Pupuk Hayati, dan Pupuk Kimia*. <http://isroi.wordpress.com>. 26/02/2008
- [23]Pelczar, M.J. and Chan, E.C.S. 2005. **Elements of Microbiology**. *Alih bahasa* : Hadioetomo, dkk. Penerbit UI. Jakarta.
- [24]Siswanto, D., Suharjo. 2006. Komunitas Kapang Tanah di Lahan Kritis Berkapur DAS Brantas pada Musim Kemarau. *Bioscientiae* 1(3):1-14.