

## Pelarutan Fosfat Anorganik oleh Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat Secara In Vitro

Budi Raharjo<sup>1</sup>, Agung Suprihadi<sup>1</sup>, Agustina D.K<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Undip

**ABSTRAK**---Fosfat merupakan nutrient essential yang diperlukan oleh tanaman dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Fosfat sebenarnya terdapat dalam jumlah yang melimpah dalam tanah, namun sekitar 95-99% terdapat dalam bentuk fosfat tidak terlarut sehingga tidak dapat digunakan oleh tanaman. Upaya untuk mengatasi masalah ini, salah satunya adalah dengan pembuatan pupuk biologi dengan mikroba pelarut fosfat sebagai agen biofertilizer. Penelitian terdahulu, diperoleh isolat jamur pelarut fosfat dari sampel tanah gambut yang sudah teruji kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh perbandingan isolat jamur pelarut fosfat yang tepat untuk digunakan sebagai formula kultur campur agar dapat melarutkan fosfat secara optimal, meningkatkan kemampuan jamur dalam melarutkan fosfat dengan adanya kerja yang sinergis dari jamur-jamur tersebut, menghasilkan pupuk biologi dengan mikroba sebagai agen biofertilizer. Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok dengan perlakuan perbandingan isolat jamur pelarut fosfat yaitu kultur jamur tunggal NSJ 1, NSJ 5, NSJ 6, kultur jamur campur NSJ 1-NSJ 5, NSJ 1-NSJ 6, NSJ 5-NSJ 6, NSJ 1-NSJ 5-NSJ 6 dan kontrol. Kontrol perlakuan digunakan medium uji Pikovskaya tanpa inokulasi jamur. Variabel yang diamati meliputi pH medium kultur, total konsentrasi fosfat yang terlarut. Setiap perlakuan diulang sebanyak empat kali. Analisis data yang digunakan analisis sidik ragam (Ansisra) dengan taraf kepercayaan 95 % untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$  dilakukan uji lanjut dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas pelarutan fosfat pada setiap perlakuan perbandingan isolat jamur F1-F7 secara umum terlihat pada perubahan medium Pikovskaya cair yang semula keruh menjadi bening. Aktivitas pelarutan fosfat mulai terlihat pada awal inkubasi (jam ke 0), dengan konsentrasi fosfat terlarut tertinggi 7,87 ppm yang dihasilkan oleh F5 dan terendah 5,33 ppm oleh F3. Konsentrasi fosfat terlarut menunjukkan penurunan setelah inkubasi 24 jam dengan memperlihatkan penurunan pH dari pH kultur awal inkubasi (jam ke 0) yang tidak begitu drastis. Pada inkubasi 48 jam, semua perlakuan mulai menunjukkan kenaikan konsentrasi fosfat terlarut. Penurunan pH pada inkubasi 48 jam ini dikarenakan adanya aktivitas metabolisme yang mensekresi asam organik. Hasil analisis sidik ragam konsentrasi fosfat terlarut pada inkubasi 48 jam, menunjukkan adanya perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) antar perlakuan perbandingan isolat jamur dalam pelarutan fosfat anorganik. Hal ini berarti bahwa formulasi perbandingan isolat jamur F1-F7 mempengaruhi pelarutan fosfat anorganik. Hasil analisis pada inkubasi 48 jam ini memperlihatkan bahwa perlakuan formulasi F7 paling tinggi dalam melarutkan fosfat dan adanya kerja sinergis dalam meningkatkan pelarutan fosfat.

*Key word: Agen biofertilizer, kultur campur, pelarutan fosfat*

### PENDAHULUAN

Pertanian di Indonesia merupakan bidang yang sangat penting saat ini, hal ini berkaitan dengan permasalahan utama yang dihadapi oleh pemerintah sekarang adalah untuk mengupayakan peningkatan produksi pertanian dalam rangka memenuhi kebutuhan pangan masyarakat yang terus meningkat dan mengurangi impor hasil pertanian. Salah satu upaya peningkatan produksi pangan tersebut berupa intensifikasi lahan-lahan pertanian, yaitu dengan menggunakan pupuk sintetik termasuk pupuk fosfat sintetik.

Fosfat merupakan nutrient essential yang diperlukan oleh tanaman dalam proses

pertumbuhan dan perkembangannya. Fosfat sebenarnya terdapat dalam jumlah yang melimpah dalam tanah, namun sekitar 95-99% terdapat dalam bentuk fosfat tidak terlarut sehingga tidak dapat digunakan oleh tanaman (Vassileva *et al.*, 1998). Peningkatan ketersediaan fosfat bagi tanaman diusahakan dengan penggunaan pupuk fosfat anorganik maupun organik. Tetapi setelah aplikasi, ternyata sejumlah besar fosfat bentuk tersedia dari pupuk langsung diubah kedalam bentuk tidak terlarut (Omar, 1998). Sehingga pemanfaatan pupuk tersebut kurang efektif sehingga memerlukan perlakuan yang berkelanjutan dan tentunya biaya yang tinggi.

Upaya untuk mengatasi masalah ini, akhir-akhir ini terpusatkan pada pemanfaatan mikroba pelarut fosfat dengan alasan mudah dimanipulasi dan murah operasionalnya. Salah satunya adalah dengan pembuatan pupuk biologi dengan mikroba pelarut fosfat sebagai agen biofertilizer. Penelitian terdahulu, diperoleh isolat jamur pelarut fosfat dari sampel tanah gambut yang sudah teruji kemampuannya dalam melarutkan fosfat (Normasari, 2005). Penelitian untuk mencari mikroorganisme pelarut fosfat yang mampu meningkatkan ketersediaan fosfat terlarut dalam tanah sangat diperlukan mengingat pemanfaatan mikroba tersebut dapat menjadi salah satu alternatif untuk intensifikasi lahan pertanian. Penelitian yang dilakukan pada sampel tanah gambut Sampit menghasilkan 3 isolat jamur pelarut fosfat yaitu NSJ 1, NSJ 5 dan NSJ 6, yang berpotensi sebagai agen biofertilizer (Normasari, 2005). Permasalahannya adalah memperoleh formula yang tepat dari kultur campur isolat jamur-jamur tersebut dengan komposisi inokulum tertentu sehingga pelarutan fosfat dapat berjalan optimal. Penelitian ini memiliki tujuan :

1. Memperoleh perbandingan isolat jamur pelarut fosfat yang tepat untuk digunakan sebagai formula kultur campur agar dapat melarutkan fosfat secara optimal
2. Meningkatkan kemampuan jamur dalam melarutkan fosfat dengan adanya kerja yang sinergis dari jamur-jamur tersebut
3. Menghasilkan pupuk biologi dengan mikroba sebagai agen biofertilizer yang dibutuhkan dalam pertanian, terutama dalam rangka menunjang peningkatan produksi pertanian.

### Mikroba Pelarut Fosfat

Mikroba pelarut fosfat meliputi berbagai jenis mikroba yang dapat mengubah senyawa fosfat tidak terlarut menjadi fosfat terlarut (Prepena-Akhaury *et al*, 1997; Raju & Reddy, 1999). *Bacillus* dan *Pseudomonas* merupakan golongan bakteri yang penting dalam pelarutan fosfat. *Aspergillus* dan *Penicillium* merupakan golongan jamur penting dalam melarutkan fosfat (Motsara *et al*, 1995). *Rhizobium* juga mempunyai kemam-

puan dalam melarutkan fosfat organik dan anorganik (Abd-Alla, 1994).

Menurut Lynch & Poole (1979), mikroba pelarut fosfat berperan dalam perubahan fosfat menjadi bentuk terlarut dengan cara :

1. Mengubah kelarutan senyawa fosfat anorganik
2. Mineralisasi senyawa organik dengan melepaskan orthophosphat
3. Mengubah fosfat anorganik yang menyediakan anion ke protoplasma sel (immobilisasi)
4. Oksidasi dan reduksi senyawa fosfat anorganik.

Mikroba pelarut fosfat mampu melarutkan Cafosfat. Spesies dari *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Aspergillus* mampu menggunakan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (apatit) atau material fosfat tidak terlarut lainnya sebagai sumber fosfat. Asam organik mampu mengubah  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (apatit) menjadi fosfat bervalensi satu ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) dan bervalensi dua ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Lynch & Poole, 1979).

Fosfor juga mengalami mineralisasi dan immobilisasi. Proses tersebut dipengaruhi oleh persentase fosfor dari sisa tanaman yang terurai dan nutrien yang dibutuhkan oleh populasi mikroba. Bila terjadi kelebihan fosfor dibanding kebutuhan nutrisi mikroba akan terjadi akumulasi fosfat anorganik. Sebaliknya jika terjadi kekurangan fosfat dalam lingkungan akan terjadi immobilisasi fosfat anorganik. Pertumbuhan mikroba membutuhkan fosfor yang penting untuk pembentukan sel. Pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh ketersediaan senyawa fosfor siap pakai dalam habitatnya (Chapelle, 2001).

### Potensi Mikroba dalam Pelarutkan Fosfat

Kemampuan mikroba pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat yang terikat dapat diketahui dengan membiakkan biakan murninya pada media agar Pikovskaya atau media agar ekstrak tanah yang berwarna putih keruh karena mengandung P tidak terlarut seperti kalsium fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Pertumbuhan mikroba pelarut fosfat dicirikan dengan adanya zona bening di sekitar koloni mikroba yang tumbuh, sedangkan mikroba yang lain tidak menunjukkan ciri tersebut (Gambar 02.).

Kemampuan mikoba pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat tidak terlarut juga dapat diuji secara kuantitatif dengan menggunakan medium Pikovskaya cair (Isroi, 2005).



Gambar 01. Pelarutan fosfat oleh mikroba (Isroi, 2005)

Hasil penelitian Sen & Paul (1957) menunjukkan bahwa bakteri-bakteri seperti *Bacterium subtilis*, *Bacterium mycoides* dan *Bacterium mesentericus* mampu melarutkan  $\text{FePO}_4$  (2,1-7,1%),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (3,2-9,6%), glisero-fosfat (3,6-13,2%), lesitin (5,7-21,2%) dan tepung tulang (14,22%). Jenis jamur yang banyak diteliti adalah *Aspergillus* sp dan *Penicillium* sp. Kelompok *Penicillium* sp dapat melarutkan 25,9-39,0% dari  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , sedangkan *Aspergillus* sp melarutkan 17,8% (Rao, 1982). Asam sitrat yang dihasilkan oleh *Aspergillus awamori* berperan dalam melarutkan Ca-fosfat. *Aspergillus niger* menunjukkan pertumbuhan yang kuat dengan sumber P dari senyawa  $\text{AlPO}_4$ , sedangkan *Penicillium* sp sama baiknya pada media  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ , dan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Anas & Premono, 1989). *Aspergillus flavus* memiliki kemampuan memproduksi asam organik terbesar (1,835 g/l) daripada *Penicillium canscens* dan *Aspergillus niger* (Rashid *et al.*, 2004).

Penelitian yang berkaitan dengan pemanfaatan mikroba pelarut fosfat telah banyak dilakukan. Di India telah dilakukan eksperimen lapangan menggunakan suspensi kultur dari *Bacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas striata* dan *Aspergillus awamori* dengan dan tanpa penambahan super fosfat atau batuan fosfat pada tanaman gandum dan padi. Hasilnya menunjukkan adanya peningkatan secara signifikan pada tanaman gandum yang diinokulasikan dengan *P. striata* dengan penambahan batuan fosfat 100 kg  $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$  (Gaur *et al.*, 1980).

### Kultur Campur Mikroba Pelarut Fosfat

Penggunaan kultur campur mikroba pelarut fosfat sudah mulai dikembangkan. Kultur campur mikroba pelarut fosfat dapat meningkatkan efektivitas pelarutan fosfat anorganik dalam tanah sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman. Interaksi antara *Rhizobium leguminosarum* dengan jamur pelarut fosfat seperti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* dan *Penicillium pinophilum* mampu meningkatkan efektivitas pelarutan fosfat anorganik dibandingkan dengan kultur tunggal *Rh. leguminosarum* (Mehana & Wahid, 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Mujib dkk. (2002) menunjukkan bahwa perlakuan *P. aeruginosa* baik yang tunggal maupun yang dikombinasi dengan pupuk fosfat tidak berbeda nyata dalam peningkatan luas daun, tetapi pada perlakuan isolat gabungan *P. putida* dan *P. aeruginosa* tanpa pupuk fosfat (POI3) diperoleh hasil kadar P tribus yang sangat nyata lebih tinggi dibandingkan isolat tunggal. Demikian juga pada perlakuan isolat gabungan *P. putida* dan *P. aeruginosa* dengan pemakaian pupuk SP-3 maupun rock fosfat mampu meningkatkan kadar P tribus dibandingkan isolate tunggal.

### Fosfat

Fosfat di dalam tanah terdapat dalam bentuk fosfat anorganik dan fosfat organik. Bentuk anorganiknya berupa senyawa-senyawa Ca-fosfat, Fe-fosfat dan Al-fosfat. Fosfor organik mengandung senyawa-senyawa yang berasal dari tanaman dan mikroba dan tersusun dari asam nukleat, fosfolipid dan fitin. Materi organik yang berasal dari sampah tanaman mati dan membusuk kaya akan sumber-sumber fosfor organik (Sutedjo, 1996).

Indranuda (1994) menjelaskan bahwa fosfor merupakan bagian integral tanaman di bagian penyimpanan (*storage*) dan pemindahan (*transfer*) energi. Fosfor terlibat pada penangkapan cahaya dari sebuah molekul klorofil. Begitu energi tersebut sudah tersimpan dalam ADP (adenosine diphosphate) atau ATP (adenosine triphosphate), maka akan digunakan untuk menjalankan reaksi-reaksi yang memerlukan energi, seperti pembentukan sukrosa, tepung dan protein.

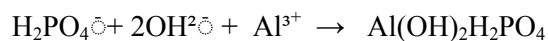
Fosfor selalu diserap oleh tanaman sebagai  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  dan  $\text{PO}_4^{3-}$  yang

terutama berada di dalam larutan tanah. Ada hubungan yang erat antara konsentrasi fosfor di dalam larutan tanah dengan pertumbuhan tanaman yang baik. Defisiensi fosfor selalu timbul akibat dari terlalu rendahnya konsentrasi  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  dan  $\text{HPO}_4^{2-}$  di dalam larutan tanah. Senyawa fosfor dalam bentuk larut yang dimasukkan ke dalam tanah untuk mengatasi defisiensi fosfor cepat sekali mengendap dan terikat oleh matriks tanah (Indranuda, 1994).

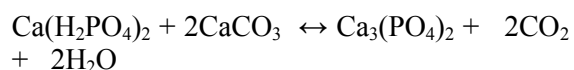
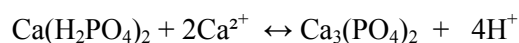
Elemen fosfor di dalam tanah kebanyakan ada dalam keadaan tidak larut, sehingga tidak mungkin masuk ke dalam sel-sel akar. Tetapi sebagai anion fosfat ia mudah bertukar dengan  $\text{OH}^-$  (Dwijoseputro, 1994).

Menurut Indranuda (1994), berdasarkan kation-kation yang bersenyawa dengan fosfor, fosfor anorganik dapat dikelompokkan ke dalam *calcium-bonded phosphates* (Ca-P), *aluminium-bonded phosphates* (Al-P), dan *iron-bonded phosphates* (Fe-P). Bentuk fosfor yang dominan di dalam tanah tergantung pada tingkat pelapukan dan pH tanah. Yang jelas, ketiga bentuk P tersebut mengikat P, sehingga konsentrasi fosfor di dalam larutan tanah selalu rendah.

Menurut Mas'ud (1993), tanah asam dengan  $\text{pH} < 5,5$  didominasi oleh kation  $\text{Fe}^{3+}$  dan  $\text{Al}^{3+}$  yang mengikat anion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  dan mengendapkannya sebagai hidroksi Fe-fosfat dan Al-fosfat melalui reaksi :



Sedangkan pada  $\text{pH} > 6,0$  sistem tanah didominasi oleh kation  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  yang juga mampu mengikat  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  dari tanah maupun pupuk fosfat sehingga menjadi dalam bentuk tidak tersedia melalui reaksi :



Senyawa-senyawa Al-fosfat dan Fe-fosfat semakin tersedia jika keasaman

meningkat hingga  $\text{pH} \leq 5,5$  dan pada  $\text{pH} > 5,5$  kelarutannya berkurang sehingga menyusutkan pengaruh meracuni dan menyusutkan kemampuannya dalam mengendapkan fosfat dari larutan tanah (Mas'ud, 1993).

### Mekanisme Pelarutan Fosfat

Mikroba pelarut P di dalam aktivitasnya akan membebaskan sejumlah asam-asam organik, seperti asam sitrat, glutamat, suksinat, laktat, oksalat, glioksalat, malat, fumarat, tartarat dan asam  $\alpha$ -keto butirat (Rao, 1982).

Tan (1982) menjelaskan bahwa meningkatnya asam-asam organik tersebut biasanya diikuti dengan penurunan pH yang tajam, sehingga berakibat terjadinya pelarutan Ca-fosfat. Selain karena penurunan pH, adanya kecenderungan  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , dan  $\text{Al}^{3+}$  untuk membentuk khelat (kompleks yang stabil) dengan asam-asam organik juga menyebabkan terjadinya pembebasan P menjadi larut. Reaksi pembentukan khelat yang membebaskan P menjadi terlarut seperti pada gambar 02.

*Aspergillus niger* memproduksi asam oksalat dan asam sitrat yang merupakan asam organik utama (Rashid *et al.*, 2004). Sedangkan *Aspergillus flavus* dan *Penicillium canescens* memproduksi asam oksalat, asam sitrat, asam glukonat dan adanya asam suksinat untuk *A. flavus* (Cunningham, 1992; Illmer *et al.*, 1995). Gaur (1990) menjelaskan bahwa ada keterkaitan antara produksi asam organik terhadap pelarutan fosfat anorganik. Produksi asam organik yang tinggi, akan diikuti dengan peningkatan pelarutan fosfat anorganik.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas kimia, tabung reaksi, jarum ose, lampu spiritus, inkubator, autoklaf, pipet ukur 1 ml, pipet ukur 5 ml, pipet ukur 10 ml, pipet tetes, mikropipet, timbangan sartorius, batang pengaduk, gelas ukur, corong, vortex, *desicator*, spektrofotometer, sentrifuge, *rotary shaker*, pH meter, penyaring Seitz dan *vacuum pump*, oven.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat jamur NSJ 1, NSJ 5 dan NSJ 6; medium

Pikovskaya (1% glukosa, 0.02% NaCl, 0.5%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.05%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.02% KCl, 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.00025%  $\text{MnSO}_4$ , 0.00025%  $\text{FeSO}_4$ , 0.05% gram *yeast extract*, 1.5% agar), kertas saring What man no. 42, reagen *Ammonium molybdate* (asam sulfat, *ammonium molybdate*), reagen *Stannous chloride* ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , gliserin), akuades, HCl.

### Cara Kerja

Tahapan-tahapan penelitian yang dilaksanakan meliputi :

#### Pembuatan Reagensia Metode *Stannous Chloride*

Preparasi reagen *Ammonium molybdate* Asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) sebanyak 280 ml ditambahkan dalam akuades hingga volumenya 400 ml. Sebanyak 25 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (*ammonium molybdate*) dilarutkan dalam 175 ml akuades. Ketika larutan asam sudah menjadi dingin, ditambahkan larutan *molybdate* dan akuades hingga volumenya 1 liter.

Preparasi reagen *Stannous chloride* sebanyak 2,5 gram  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan ke dalam 100 ml gliserin, larutan dipanaskan untuk mempercepat kelarutan.

#### Pembuatan medium Pikovskaya

Medium Pikovskaya dibuat dengan memasukkan 10 gram glukosa, 0.2 gram NaCl, 5 gram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.5 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 gram KCl, 0.1 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0025 gram  $\text{MnSO}_4$ , 0.0025 gram  $\text{FeSO}_4$ , 0.5 gram *yeast extract* ke dalam erlenmeyer ukuran 1 liter. Campuran bahan-bahan tersebut kemudian dilarutkan dengan 1 liter aquades dan diaduk. Larutan medium dipanaskan dalam penangas air hingga semua bahan larut homogen. Larutan medium dalam autoklaf pada  $121^\circ\text{C}$ , 1atm, selama 15-20 menit.

#### Peremajaan dan Pemeliharaan Isolat

Isolat jamur pelarut fosfat NSJ 1, NSJ 5 dan NSJ 6 ditumbuhkan pada medium Pikovskaya Agar selama 7 hari pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Isolat yang tidak dipakai disimpan pada suhu  $4^\circ\text{C}$ .

#### Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan isolat jamur NSJ 1, NSJ 5 dan NSJ 6 dapat dinyatakan dengan konsentrasi biomassa menggunakan metode gra-

vimetri. Metode gravimetri dilakukan sebagai berikut: biakan murni NSJ 1, NSJ 5 dan NSJ 6 pada media PKVA miring umur 4 hari yang diinkubasi pada suhu ruang dibuat suspensi dengan menambahkan akuades steril 5 ml. Kemudian sebanyak 1% (v/v) suspensi jamur diinokulasikan ke dalam media Pikovskaya cair 100 ml dan diinkubasi selama 7 hari pada *rotary shaker* 150 rpm. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam, mengukur biomassa jamur yaitu menyaring kultur cair jamur dalam media Pikovskaya cair dengan penyaring Seitz yang telah diberi kertas saring. Setelah airnya hilang kemudian diletakkan dalam kertas saring yang masih kering, kemudian dimasukkan ke dalam oven yang bersuhu  $80^\circ\text{C}$ , sampai mencapai berat kering konstan, baru dilakukan penimbangan dengan neraca sartorius. Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat kering kertas saring merupakan berat kering jamur (gram/100ml).

#### Pembuatan Starter

Dari kurva pertumbuhan akan diketahui fase log maksimal masing-masing isolat. Masing-masing biakan murni NSJ 1, NSJ 5 dan NSJ 6 pada media PKVA miring umur 4 hari yang diinkubasi pada suhu ruang dibuat suspensi dengan menambahkan akuades steril 5 ml kemudian diinokulasikan pada media starter sebanyak 5% (v/v), diinkubasi pada *rotary shaker* 150 rpm pada suhu ruang hingga diperoleh fase log maksimal. Berdasarkan fase log pertumbuhan kultur diambil sejumlah suspensi kultur (10%) yang diinokulasikan ke dalam medium uji pelarut fosfat (Pikovskaya cair).

#### Inokulasi Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat

Pada percobaan ini dibuat 7 perlakuan perbandingan isolat jamur pelarut fosfat yaitu

	NSJ 1	:	NSJ 5	:	NSJ 6
F1 =	1	:	0	:	0
F2 =	0	:	1	:	0
F3 =	0	:	0	:	1
F4 =	1	:	1	:	0
F5 =	1	:	0	:	1
F6 =	0	:	1	:	1
F7 =	1	:	1	:	1

Masing-masing kultur campur jamur tersebut (F1-F7) diinokulasikan pada media PKV steril. Suatu kontrol dibuat yaitu berupa medium PKV *broth* tanpa penambahan suspensi jamur. Jamur ditumbuhkan selama 7 hari pada *rotary shaker* 150 rpm dengan suhu 30 °C. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam dan pH medium diukur. Kultur disentrifuse pada 5.000 rpm selama 10 menit. Larutan yang sudah disentrifuse, disaring pada kertas saring What man No. 42 dan larutan yang bening (*clear solution*) dikumpulkan pada 100 ml *volumetric flask* dan dilakukan penambahan akuades hingga volumenya menjadi 100 ml

**Analisis Fosfat yang Tersedia**

Analisis fosfat yang tersedia dilakukan dengan menggunakan metode *Stannous chloride*. Sebanyak 25 ml larutan sampel yang akan dianalisis diambil kedalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 1ml larutan *ammonium molybdate* kemudian digojog. Setelah itu, ditambahkan 2 tetes larutan *stannous chloride* kemudian digojog. Jika terdapat fosfat terlarut, dalam intensitas maksimum setelah 5 menit, warna larutan menjadi berwarna biru.

Pengukuran warna harus dilakukan selama 5-15 menit setelah penambahan *stannous chloride*. Periode waktu tersebut merupakan periode perkembangan warna kritis. Pengukuran absorbansi warna menggunakan spektrofotometer pada 650 nm. Larutan blanko digunakan untuk menetapkan absorbansi nol.

**Pengukuran pH Kultur**

Pengukuran pH kultur sampel dilakukan setiap 24 jam. Kultur sampel diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter, sebelum penggunaan pH meter dikalibrasi terlebih dulu dengan buffer 4 dan 7 (Hadiwiyoto, 1994).

**Variabel**

Variabel yang diamati meliputi pH medium kultur, total konsentrasi fosfat yang terlarut dan pertumbuhan jamur.

**Rancangan Percobaan dan Analisis Data**

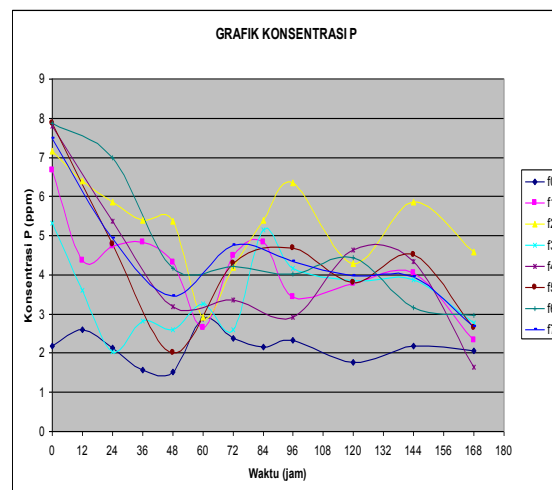
Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok dengan perlakuan perbandingan isolat jamur pelarut fosfat yaitu

	NSJ 1	:	NSJ 5	:	NSJ 6
F1 =	1	:	0	:	0
F2 =	0	:	1	:	0
F3 =	0	:	0	:	1
F4 =	1	:	1	:	0
F5 =	1	:	0	:	1
F6 =	0	:	1	:	1
F7 =	1	:	1	:	1

sebagai kontrol (F0) tanpa inokulasi isolat jamur pada medium. Setiap perlakuan diulang sebanyak empat kali. Data yang diperoleh diuji normalitas dan homoge-nitasnya. Jika asumsi normalitas dan homoge-nitas diterima, maka dilanjutkan dengan Analisis sidik ragam (Ansira) dengan taraf kepercayaan 95 % untuk mengetahui perbe-daan antar perlakuan. Jika Fhitung > Ftabel dilakukan uji lanjut dengan uji Duncan.

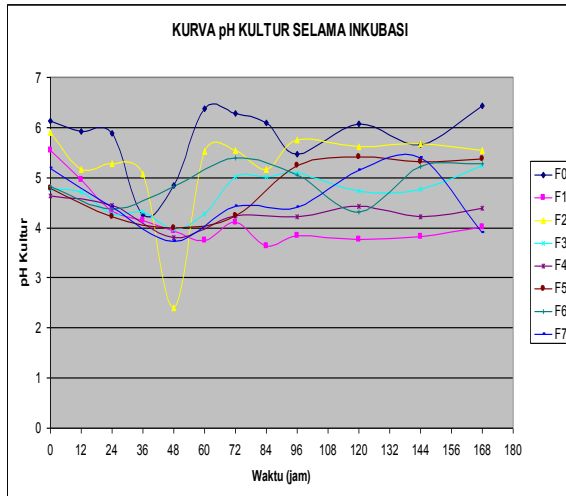
**PEMBAHASAN**

Konsentrasi fosfat terlarut oleh jamur pelarut fosfat NSJ1, NSJ5 dan NSJ6 baik kultur tunggal maupun campur disajikan pada Gambar 03.



Gambar 02. Pola grafik konsentrasi fosfat terlarut pada berbagai perlakuan perbandingan isolat jamur F1-F7 selama inkubasi 168 jam

Perubahan pH kultur selama masa inkubasi disajikan pada Gambar 04.



Gambar 03. Pola grafik pH kultur pada berbagai perbandingan isolat jamur F1-F7 selama inkubasi 168 jam

Gambar 03 menunjukkan kemampuan pelarutan fosfat kultur jamur baik tunggal maupun campur yang lebih baik dibandingkan dengan F0 (kontrol / tanpa inokulasi jamur) dengan kecenderungan profil yang hampir sama. Aktivitas pelarutan fosfat mulai terlihat pada awal inkubasi (jam ke 0), dengan konsentrasi fosfat terlarut tertinggi 7,87 ppm yang dihasilkan oleh F5 dan terendah 5,33 ppm oleh F3. Aktivitas pelarutan fosfat yang terjadi pada awal inkubasi ini merupakan aktivitas tertinggi pada semua perlakuan dikarenakan kultur jamur yang diinokulasikan sebagai starter telah memasuki fase log pertumbuhan dan mensekresi asam organik sehingga telah terjadi aktivitas pelarutan fosfat. Griffin (1994) menyatakan bahwa pada fase log pertumbuhan, jamur mensekresikan suatu substansi asam yang menyebabkan medium menjadi basi. Substansi ini umumnya diproduksi oleh beberapa strain seperti *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* dan strain yang memiliki aktivitas yang besar.

Konsentrasi fosfat terlarut menunjukkan penurunan setelah inkubasi 24 jam. Penurunan konsentrasi fosfat terlarut ini diduga disebabkan oleh adanya pemakaian kembali fosfat terlarut oleh kultur jamur sebagai sumber nutrisi untuk aktivitas metabolismenya. Adanya fosfat terlarut yang tinggi dalam medium digunakan untuk aktivitas respirasi oksidatif yang berperan

dalam transfer atau konsumsi glukosa ke dalam sel untuk pembentukan energi ATP dan biomassa sehingga akan meningkatkan pertumbuhan. Hawker (1950) menyatakan bahwa fosfor harus disuplai dengan jumlah yang cukup dalam medium untuk proses fosforilasi karbohidrat bagian akhir dan pembentukan energi dalam sintesis bahan organik kompleks yang biasanya diturunkan dari komponen fosfor kaya energi. Fosfor juga termasuk dalam komposisi fosfolipid yang merupakan unsur penting sel *yeast* dan asam nukleat. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Khalil (1995) dan Gaur (1990) bahwa unsur fosfor seperti nitrogen dapat dimineralisasi dan diimobilisasi, sangat esensial untuk sintesis sel mikroba dan kebanyakan strain jamur mengimobilisasi fosfor dalam jumlah yang lebih besar daripada strain bakteri. Disamping itu, menurut Poeponogoro (2005), adanya kandungan fosfat terlarut yang tinggi dalam medium dapat menghambat aktivitas enzim fosfofruktokinase dan piruvat dekarboksilase yang berperan dalam glikolisis untuk pembentukan asam piruvat dan asetil ko-A yang dibutuhkan dalam biosintesis asam organik. Adanya penghambatan dalam biosintesis asam organik menyebabkan penghambatan proses pelarutan fosfat. Tan (1982) menjelaskan bahwa meningkatnya asam-asam organik yang diikuti dengan penurunan pH yang tajam, dapat berakibat terjadinya pelarutan Ca-fosfat. Selain karena penurunan pH, adanya kecenderungan  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , dan  $\text{Al}^{3+}$  untuk membentuk khelat (kompleks yang stabil) dengan asam-asam organik juga menyebabkan terjadinya pembebasan P menjadi larut. Hasil pengukuran pH kultur (Gambar 04) juga memperlihatkan bahwa pada inkubasi 24 jam tidak menunjukkan penurunan yang drastis dari pH kultur awal inkubasi (jam ke 0).

Pada inkubasi 48 jam, semua perlakuan mulai menunjukkan kenaikan konsentrasi fosfat terlarut. Kenaikan tersebut disebabkan oleh adanya pembentukan kembali asam organik, hal ini dapat dilihat pada pH kultur medium yang mengalami penurunan secara drastis (Gambar 04), khususnya pada perlakuan F2 yang menunjukkan adanya korelasi antara pH dengan pelarutan fosfat dimana konsentrasi fosfat terlarut paling tinggi dengan

pH kultur paling rendah. Adanya penurunan fosfat terlarut pada inkubasi 24 jam menyebabkan penurunan energi ATP, sehingga mengaktifkan kembali enzim piruvat karboksilase pada proses glikolisis yang berperan dalam biosintesis asam organik. Poeponegoro (2005) menyatakan bahwa terjadinya defisiensi fosfat di dalam medium menyebabkan aktivitas sistem transpor asam sitrat menurun sel menjadi meningkat sehingga merangsang ekskresi asam sitrat ke luar sel. Asam organik tersebut mampu memecah komponen apatit Ca-fosfat dalam medium yang merupakan bentuk fosfat tidak larut menjadi bentuk terlarut (Rao, 1994 dan Alexander, 1961). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Burgs taller *et al.* (1992), bahwa *Aspergillus* dan *Penicillium* melarutkan fosfat dengan memproduksi sejumlah besar asam organik, demikian juga dengan hasil penelitian Illmer (1995) bahwa *Aspergillus niger* memproduksi asam sitrat, oksalat dan glukonat dalam melarutkan fosfat. Perubahan pH kultur pada inkubasi 48 jam terlihat mencolok dengan pelarutan fosfat yang lebih rendah bila dibandingkan dengan inkubasi 0 jam, hal ini dikarenakan adanya pengikatan fosfat terlarut oleh biomassa jamur sehingga fosfat terlarut dalam medium rendah. Penurunan pH pada inkubasi 48 jam ini dikarenakan adanya aktivitas metabolisme yang mensekresi asam organik.

Aktivitas pelarutan fosfat pada setiap perlakuan perbandingan isolat jamur F1-F7 secara umum terlihat pada perubahan medium Pikovskaya *broth* yang semula keruh menjadi bening. Perubahan medium kultur selama masa inkubasi ini disebabkan oleh adanya pemecahan ikatan senyawa trikalsium fosfat dalam medium menjadi fosfat terlarut oleh kultur jamur. Menurut Katznelson dan Bose (1959), Sundara Rao dan Sinha (1962) dan Das (1963), jamur dikatakan bisa melarutkan fosfat apabila jamur dikelilingi zona berwarna terang.

Hasil pengukuran fosfat terlarut pada perlakuan F0 (kontrol / tanpa inokulasi jamur) menunjukkan adanya fosfat terlarut dan penurunan pH kultur pada awal inkubasi (jam ke 0), hal ini diduga disebabkan adanya pengaruh pemanasan pada proses sterilisasi autoklaf yang mengakibatkan terpecahnya ikatan Ca-fosfat pada medium secara fisik menjadi bentuk fosfat terlarut. Adanya bahan

glukosa pada medium uji oleh pemanasan menyebabkan keasaman pada medium sehingga pH medium menjadi turun..

Hasil analisis sidik ragam konsentrasi fosfat terlarut pada inkubasi 48 jam, menunjukkan adanya perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) antar perlakuan perbandingan isolat jamur dalam pelarutan fosfat anorganik. Hal ini berarti bahwa formulasi perbandingan isolat jamur F1-F7 mempengaruhi pelarutan fosfat anorganik. Hasil analisis pada inkubasi 48 jam ini memperlihatkan bahwa perlakuan formulasi F7 paling tinggi dalam melarutkan fosfat dan adanya kerja sinergis dalam meningkatkan pelarutan fosfat. Kultur campur mikroba pelarut fosfat dapat meningkatkan efektivitas pelarutan fosfat anorganik dalam tanah sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman. Interaksi antara *Rhizobium leguminosarum* dengan jamur pelarut fosfat seperti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* dan *Penicillium pinophilum* mampu meningkatkan efektivitas pelarutan fosfat anorganik dibandingkan dengan kultur tunggal *Rhizobium leguminosarum* (Mehana dan Wahid, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian ini maka isolat jamur pelarut fosfat NSJ1, NSJ 5 dan NSJ 6 berpotensi untuk dikaji lanjut potensinya dalam penyediaan pupuk biologi yang dapat meningkatkan ketersediaan fosfat terlarut dalam tanah sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman.

## KESIMPULAN

Perbandingan isolat jamur pelarut fosfat yang tepat untuk digunakan sebagai agen biofertilizer yang dapat melarutkan fosfat secara optimal adalah formulasi F7, kultur campur jamur NSJ1, NSJ5 dan NSJ6. Kultur campur jamur menunjukkan adanya kerja sinergis dalam meningkatkan pelarutan fosfat.

Perlu penelitian lebih lanjut tentang formulasi kultur campur F7 dengan carier seperti tanah gambut, batu apung yang diaplikasikan sebagai pupuk biologi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:



1. Direktorat Jendral Perguruan Tinggi (DIKTI) melalui Program PKMP yang telah memberikan dana bagi penelitian ini
2. Normasari, Hevi Diyowati, Salamah, Kiki Bayu Wardani atas bantuan selama penelitian berlangsung

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Abd-Alla, M. H. 1994. Phospahtes and Utilization of Organic Phosphorus by *Rhizobium leguminosarum biovar viceae*. Letters of Applied Microbiol. 18 : 294-296
2. Anas, Iswandi, & M. Edi Premono. 1989. Mikroba Tanah Pelarut Fosfat dan Peranannya dalam Pertanian. jurnal Kongres Nasional V. Himpunan Ilmu Tanah Indonesia. Medan
3. Alexander, M. 1961. Introduction to Soil Microbiology, John Wiley & Sons Inc. New York and London
4. Burgstaller, W., H. Strasser & F. Shinner. 1992. Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: Bioreaktor, lerching and stoichiometri. Environmental Sci. and Technol. 26:340-346
5. Chapelle, F. H. 2001. Ground-Water Microbiology and Geochemistry. John Wiley and Sons. New York
6. Cunningham, J. E. & C. Kuiack. 1992. Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. Applied and Environmental Microbiol. 58:1451-1458
7. Das, A. C. 1963. Utilization of Insoluble Phosphates by Soil Fungi. J. Indian Soc. Soil Sci. 11:203-207
8. Dwijoseputro. 1994. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djembatan. Jakarta
9. Gaur, A. C. 1990. Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizer. Omega Scientific Publisher. New Delhi. 176
10. Griffin, David H. 1994. Fungal Phisiology second edition. Wiley-Liss, Inc. United States of America
11. Hawker, Lilian E. 1950. Physiologi of Fungi. University of London Press LTD. Warwick Square. London. E.C.4
12. Illmer, P. & F. Schinner. 1995. Phosphate Solubilizing Microorganism Under Non-Sterile Condition. Bodenkultur, 46 : 197-204
13. Indranuda, H. K. 1994. Pengelolaan Kesuburan Tanah. Cetakan ke-3. Bumi Aksara. Bandung
14. Isroi, 2005. Bioteknologi Mikroba untuk Pertanian Organik. <http://www.ipardboo@ondo.net.id>. Selasa, 17 Mei 2005
15. Katznelson, H. And Bose, B. 1959. Metabolic Activity and Phosphate Dissolving Capability of Bacterial Isolates from Wheat Roots, Rizosphere and Non Rhizosphere Soil. Canadian J. Microbiol. 5(1): 79-85
16. Khalil, S. 1995. Direct Application of phosphate rock and appropriate technology fertilizers in Pakistan. Proc. International Workshop, Direct application of rock phosphate and appropriate technology fertilizers in Asia-What hinders acceptance and growth, Februari 20-25. Kandy. Sri Lanka, pp:231-236
17. Lynch, J. M. & N. J. Poole. 1979. Microbial Ecology A Conceptual Approach. Blackwell Scientific Publications. Oxford
18. Mas'ud. 1993. Telaah Kesuburan Tanah. Angkasa. Bandung
19. Motsara, M. R., P. B. Bhattacharyya and B. Srivastava. 1995. Biofertilizer-their Description and Characteristics In: Biofertilizer Technology, Marketing and Usage, A sourcebook-cum-Glossary. Fertilizer development and consultation organization 204-204 A Bhanot Corner, 1-2 Pamposh Enclave. New Delhi. India
20. Normasari. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Jamur Pelarut Fosfat dari Sampel Tanah Gambut Sampit. Biologi Undip. Semarang
21. Omar, S. A. 1998. World Journal Microbial Biotech. 14 : 211-218
22. Poeponegoro, Milono. 2005. Pengaruh Limitasi Nutrien Pada Fermentasi Asam Sitrat Secara Biak-Rendam Dengan Kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414 . ITB Central Library. Bandung
23. Prerena-Akhaury, K. K. Kapoor & P. Akhaury. 1997. Solubilization of Insoluble Phosphates by Fungi Isolated from Compost and Soil. Environ. Ecol. 15: 524-527

24. Raju, R. A. & M. N. Reddy. 1999. Effect of Rock Phosphate Amended with Phosphate Solubilizing Bacteria and Farmyard Manure in Wetland Rice (*Oryza sativa*). Indian J. Agril. Sci. 69 : 451-453
  25. Rao, Subba N. S. 1982. Biofertilizer in Agriculture. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi
  26. Rashid, M. *et al.* 2004. Organic Acid Production and Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) Under *In Vitro* Conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences 7 (2): 187-196
  27. Sundara Rao, W. C. B. & Sinha, M. K. 1962. Phosphate Dissolving Microorganisms in The Soil and Rhizosphere. Indian J. Sci. 23:272-278
  28. Sutedjo, Mul Mulyani, dkk, 1996. Mikrobiologi Tanah. Rineka Cipta. Jakarta
  29. Tan, K. H. 1982. Principles of Soil Chemistry. Marcel Decker Inc. New York
  30. Vassileva, M., Vassilev, N., R. Azcon. 1998. World Journal Microbial Biotech. 14 : 281-284
  31. Watanabe, F. S. & S. R. Olsen. 1965. Test of An ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO<sub>3</sub> Extract from Soil. Soil Sci. Soc. Amer. Proceed. 29: 677-678
-