



SELEKSI MIKROBA RIZOSFER INDIGEN UNTUK BAHAN BIOAKTIF PADA INOKULAN BERBASIS KOMPOS IRADIASI

Dadang Sudrajat, Nana Mulyana dan Arief Ardhari
Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi-BATAN, Jakarta

dadasudra61@yahoo.com

Salah satu komponen utama sebagai bahan aktif bahan pembawa (*carrier*) kompos iradiasi untuk pembuatan pupuk organik hayati (POH) adalah isolat mikroba potensial yang berperan dalam penyedia hara serta hormon pemacu pertumbuhan. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat-isolat mikroba pada daerah perakaran tanaman (rizosfer), selanjutnya dilakukan isolasi dan seleksi sehingga diperoleh isolat potensial yang berkemampuan fiksasi nitrogen (N_2), menghasilkan hormon pertumbuhan (Asam Indol Asetat), dan melarutkan fosfat. Isolat potensial tersebut kemudian digunakan sebagai bahan bioaktif pada pembuatan formulasi inokulan konsorsium mikroba rizosfer berbasis kompos radiasi. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah isolasi mikroba dari beberapa lokasi di wilayah Jawa Barat, dan Jawa Tengah. Dari hasil isolasi mikroba dari 48 contoh tanah rizosfer, diperoleh 116 isolat. Selanjutnya dilakukan seleksi, dan identifikasi mikroba, untuk memperoleh isolat yang unggul. Parameter yang diukur adalah analisis kandungan AIA dengan metode kolorimetri, uji penambat N_2 dengan metode Uji Reduksi Asetilen (ARA) menggunakan Gas Kromatografi, uji kelarutan fosfat secara kualitatif (dalam media pikovskaya) dan uji kuantitatif fosfat terlarut (spektrofotometri). Evaluasi kemampuan isolat terpilih terhadap pertumbuhan tanaman jagung dilakukan di dalam pot. Isolat hasil evaluasi akan digunakan sebagai inokulan konsorsium mikroba rizosfer berbasis kompos iradiasi. Berdasarkan hasil seleksi terhadap isolat bakteri diperoleh 8 isolat unggul bakteri yang sudah diidentifikasi sebagai *Bacillus circulans* (3 isolat), *Bacillus stearothermophilus* (1 isolat), *Azotobacter sp* (3 isolat) *Pseudomonas diminuta* (1 isolat). Kemampuan pelarutan fosfat yang tertinggi diperoleh isolat BD2 (*Bacillus circulans*) yaitu sebesar 91,21mg/l dengan ukuran zona bening dalam medium pikovskaya 1,42cm. Kemampuan produksi hormon AIA yang paling tinggi dicapai isolat *Pseudomonas diminuta* (kode KAC1) yaitu sebesar 74,34 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan Kemampuan fiksasi N_2 tertinggi dicapai isolat *Azotobacter sp* (kode KDB2) yaitu sebesar 235,05 nmol/jam. Hasil uji viabilitas sel delapan (8) isolat terpilih dalam bahan pembawa kompos iradiasi sedikit mengalami penurunan selama 3 bulan penyimpanan. Inokulan dalam bahan pembawa kompos iradiasi mampu memacu pertumbuhan tanaman jagung. Inokulan yang berisi isolat *Azotobacter sp* (KDB2) merupakan inokulan paling potensial.

Kata kunci : Mikroba rizosfer, isolasi, seleksi, kompos iradiasi, inokulan

PENDAHULUAN

Dalam upaya mengurangi pencemaran lingkungan dan pemanasan global di lahan pertanian yang disebabkan oleh penggunaan pupuk kimia yang berlebihan, maka perlu dicari alternatif penggunaan pupuk yang ramah lingkungan. Pupuk berbasis mikroba dalam hal ini pupuk organik hayati (POH) merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah untuk mengurangi ketergantungan akan tersedianya pupuk kimia.

Sebagian besar mikroba tanah berpotensi sebagai bahan aktif pupuk organik hayati, terutama kelompok mikroba yang hidup pada daerah perakaran (*rhizosphere*). Kelompok mikroba tersebut diketahui mempunyai kemampuan untuk memfiksasi N_2 , penghasil hormon pemacu pertumbuhan, dan melarutkan fosfat, serta hara lainnya (Glick, 1995), telah terbukti dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman (Cattelan, 1999). Mekanisme peningkatan ini tidak diketahui secara pasti, tetapi diduga melibatkan proses yang kompleks termasuk disolusi senyawa polipeptida, oksidasi,

dan reduksi. Proses solubilisasi dan insolubilisasi unsur hara makro dan mikro di dalam tanah banyak dipengaruhi oleh pH dan status mikrobial tanah yang pada akhirnya berpengaruh terhadap ketersediaan unsur hara tersebut bagi tanaman. Ketersediaan fosfat di dalam tanah pada umumnya terbatas, karena sebagian besar fosfat difiksasi oleh Fe dan Al menjadi Fe-fosfat dan Al-fosfat terutama pada tanah mineral masam (pH < 5). Pada pH yang tinggi (pH > 7) fosfat akan terikat menjadi Ca-fosfat. Ca-fosfat yang sulit larut dapat tersedia bagi tanaman melalui proses pelarutan dan pembentukan senyawa organik oleh mikroba tanah (Cunningham dan Kuyack, 1992).

Secara umum, fungsi PGPR dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman dibagi dalam tiga kategori, yaitu: (1) Sebagai pemacu/perangsang pertumbuhan (biostimulan) dengan mensintesis dan mengatur berbagai zat mengatur tumbuh (fitohormon) seperti asam indolasetat (AIA), giberelin, dan sitokinin dalam lingkungan akar; (2) sebagai penyedia hara dengan menambat N_2 dari udara secara asimbiosis dan melarutkan hara P yang terikat dalam tanah. (Catellan *et.al.*, 1999). Dalam beberapa kasus satu strain PGPR memiliki kemampuan lebih dari satu kategori fungsi sebagai penyedia hara, penambat N_2 , dan perangsang pertumbuhan yang menjadi satu kesatuan yang tidak bisa dipisahkan.

Azotobacter sp yang diisolasi dari tanah masam Jawa Barat mempunyai kemampuan dalam penambatan nitrogen yang unggul (>400 mg/g b.k sel). Selain itu isolat *Azotobacter* juga mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh, seperti Indol Asam Asetat (IAA) (Wedhastri, 1999). Sifat inilah yang menjelaskan pengaruh menguntungkan *Azotobacter* sehubungan dengan peran IAA dalam meningkatkan perkembangan dan pembelahan sel tanaman. IAA merangsang perkembangan akar dan memperbanyak bulu-bulu akar tanaman padi (Razie dan Anas, 2005), dengan demikian pengambilan unsur hara melalui akar meningkat dan efektifitas pemupukan dapat dilakukan.

Berdasarkan hal-hal tersebut diatas, penelitian ini bertujuan melakukan seleksi mikroba dari tanah rizosfer disekitar Jawa Barat dan Jawa Tengah. Dari hasil seleksi ini diharapkan akan mendapatkan isolat mikroba potensial yang dapat dikembangkan sebagai bahan aktif pupuk organik hayati.

Untuk menginokulasikan mikroba unggul ke dalam tanah atau akar tanaman diperlukan medium bahan pembawa (*carrier*), tetapi jenis bahan pembawa yang tepat bagi mikroba ini belum banyak diteliti. Bahan pembawa merupakan faktor terpenting pada pembuatan pupuk organik hayati (POH), karena berfungsi sebagai media pertumbuhan mikroba target yang digunakan dari proses inokulasi, penyimpanan hingga penebaran pupuk (Roughley, 1986). Menurut Somasegaran dan Hoben (1985), bahan pembawa yang baik untuk pupuk hayati harus memenuhi persyaratan antara lain,

(1) tidak mengandung toksin bagi strain mikroba inokulan, (2) memiliki kapasitas penyerapan air yang tinggi, (3) mudah diproses, (4) mudah disterilkan dengan *autoclave* maupun iradiasi sinar gamma, (5) memiliki jumlah yang cukup, (6) murah, dan (7) memiliki kapasitas pH buffer yang baik dengan kisaran 6,5-7,0. Pada umumnya bahan pembawa yang sering digunakan adalah gambut. Pemanfaatan tanah gambut sebagai medium pembawa memiliki beberapa kelebihan. Selain memiliki kapasitas memegang kelembaban yang tinggi dan kandungan materi organik yang tinggi yang sangat penting untuk kehidupan naungan kultur bakteri yang lebih baik, tanah gambut juga meningkatkan kelestarian sel, terutama di dalam kondisi tanah yang kering (Rao, 1994). Penggunaan gambut sebagai bahan pembawa tidak direkomendasikan di beberapa negara, karena tidak selalu tersedia di setiap tempat dan dapat mengganggu kelestarian ekosistem di daerah penambangan gambut tersebut. Bahan lain yang dapat dimanfaatkan sebagai medium pembawa adalah kompos dan vermikompos. Kompos, merupakan kompos yang diolah dari limbah pertanian secara aerobik. Kompos yang telah masak mengandung berbagai nutrisi penting yang dibutuhkan tanaman. Pemanfaatan vermikompos tersebut sebagai bahan pembawa potensial pengganti gambut telah berhasil dikembangkan PATIR-BATAN (Mulyana dan Dadang, 2009). Pada penelitian tersebut digunakan bahan pembawa berbasis kompos yang disterilkan menggunakan iradiasi sinar gamma pada dosis 25 kGy, terbukti dapat meningkatkan viabilitas mikroba target sekaligus dapat meningkatkan fungsi kompos itu sendiri sebagai pupuk organik hayati.

METODOLOGI

Pengambilan Contoh. Contoh tanah diambil dari daerah rizosfer beserta akar tanamannya. Contoh tanah tersebut diambil pada tanah masam disekitar Bogor (Jawa Barat), Wonosobo dan Bantul (Jawa Tengah). Contoh tanah tersebut dimasukkan kedalam kantung plastik dan diberi label yang memberikan keterangan mengenai lokasi dan waktu pengambilannya.

Isolasi dan Seleksi Mikroba Potensial. Isolasi bakteri dari rizosfer dilakukan dengan metode pengenceran berseri. Tanah disekitar perakaran (rizosfer) tanaman ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 250 ml, 90 ml larutan garam fisiologis steril (0,85% NaCl) ditambahkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil. Suspensi tanah yang telah dikocok diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah mengandung 9 ml NaClO, 85% steril, sehingga didapatkan suspensi dengan tingkat pengenceran 10^{-2} . Seterusnya dilakukan pengenceran dengan cara yang sama sehingga diperoleh suspensi 10^{-6} . Selanjutnya disebar dalam medium agar selektif

Ashby untuk kelompok *Azotobacter*, medium *Tryptic Soy Agar (TSA)* untuk kelompok *Bacillus sp*, dan medium *Kings Agar* untuk kelompok *Pseudomonas*. Koloni yang tumbuh kemudian diseleksi sehingga diperoleh isolat. Untuk memastikan bahwa genus mikroba tersebut, maka dilakukan serangkaian pengujian yang bersifat spesifik meliputi pengamatan mikroskopis dan uji biokimia yang mengacu pada pedoman identifikasi bakteri (*Bergey's Manual Determinative Bacteriology* tahun 1994). Pada pengamatan mikroskopis didahului dengan melakukan pewarnaan gram, sehingga dapat dilihat bentuk-bentuk bakteri dan kelompok bakteri gram positif atau negatif. Sedangkan uji biokimia dan identifikasi sampai tingkat spesies dilakukan di Laboratorium Penguji IPB Bogor.

Uji Kemampuan Melarutkan Fosfat (P). Kemampuan melarutkan fosfat dari isolat dilakukan secara kualitatif pada cawan petri yang berisi media agar *Pikovskaya* dengan komposisi per liter sebagai berikut: *Glukosa* (10 g), *Trikalsium fosfat* (Ca_3PO_4) (5g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), *KCl* (0,2 g), *Mg SO₄ · 7H₂O* (0,1 g), *Mn SO₄* (*trace*), *Fe SO₄* (*trace*), ekstrak ragi (*yeast extract*) (0,5 g) dan agar *bacto* (20gr). Isolat yang membentuk zona bening (*holozone*) paling cepat dengan diameter *holozone* paling besar dipilih. Selanjutnya dilakukan uji kemampuan melarutkan fosfat secara kuantitatif dalam media *Pikovskaya* cair menurut metode *Gaur* (1981). Pada erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml media *Pikovskaya* cair masing-masing erlenmeyer diberi isolat mikroba yang berbeda. Erlenmeyer yang berisi biakan tersebut digojok dalam shaker dengan kecepatan putar 120 rpm selama 8 hari. Setiap dua hari diamati P yang dapat larut yang dicirikan dengan adanya ortofosfat pada larutan.

Pengujian Kemampuan Fiksasi N₂. Kemampuan isolat dalam memfiksasi N₂ diukur dengan metode Reduksi Asetilen (ARA) (Turner & Gibson,1980) atau kemampuan enzim nitrogenase yang dihasilkan isolat untuk mereduksi asetilen (C₂H₂). Pengukuran ARA dilakukan pada isolat berumur empat hari yang dibiakkan dalam medium semi padat *NFB*. Udara yang ada didalam kultur dibuang, kemudian gas asetilen dengan volume sama dengan volume udara yang dibuang diinjeksikan ke dalamnya. Setelah inkubasi selama satu jam, gas asetilen yang terbentuk diukur dengan alat Kromatografi Gas.

Analisis Kandungan Asam Indole Asetat (AIA). Untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan hormon pertumbuhan Asam Indol Asetat (AIA) secara *in vitro*, isolat ditumbuhkan dalam 20 ml medium *Luria Bertani (LB)* cair yang mengandung triptofan (Bricc. *et.al.*, 1991), masing-masing dilakukan tiga kali ulangan dan diinkubasi selama 7 hari dalam *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Biakan kemudian disentrifus 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 2 ml dan ditambah 1 ml pereaksi *Salkowsky* (Gordon & Weber, 1997), didiamkan selama

1 jam. Warna *pink* yang terbentuk diukur absorbansinya pada alat spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Kadar AIA dihitung setelah dibandingkan dengan konsentrasi larutan standar AIA murni ($\mu\text{g/ml}$).

Uji Viabilitas dan Stabilitas Mikroba dalam Bahan Pembawa Kompos Iradiasi.

Isolat terpilih masing-masing dengan kepekatan 10^{12} sel/ml dalam medium TSB sebanyak 1 ml diinokulasikan pada sachet yang berisi 9 gr bahan pembawa berbasis vermikompos yang telah disterilkan dengan iradiasi 25 kGy, kemudian disimpan selama 3 bulan. Tiap bulan dilakukan pengamatan viabilitas mikroba dalam bahan pembawa. Sebanyak 1 gr inokulan dimasukkan dalam larutan NaCl 0,85% steril pada tabung reaksi sebagai pengenceran pertama (10^{-1}). Selanjutnya diambil 100 ul dimasukkan kedalam 900 ul larutan NaCl 0,85% dalam seri pengenceran sampai 10^{-11} . Dari pengenceran terakhir diambil 0,1 ml kemudian ditanam dalam media TSA dalam cawan petri, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri dihitung dengan metode *plate count*.

Uji Efektivitas inokulan Isolat Terpilih. Pengujian efektivitas isolat terpilih sebagai inokulan dalam bahan pembawa vermikompos iradiasi dilakukan pada tanaman jagung dalam pot. Dosis perlakuan yang diberikan adalah sebesar 1 gram bahan pembawa/pot atau setara dengan 10^{12} cfu/gr. Sebagai kontrol diberikan pupuk 50%kompos+50%NPK. Pengamatan pertumbuhan tanaman meliputi tinggi dan bobot kering biomassa tanaman pada 35 hari setelah tanam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

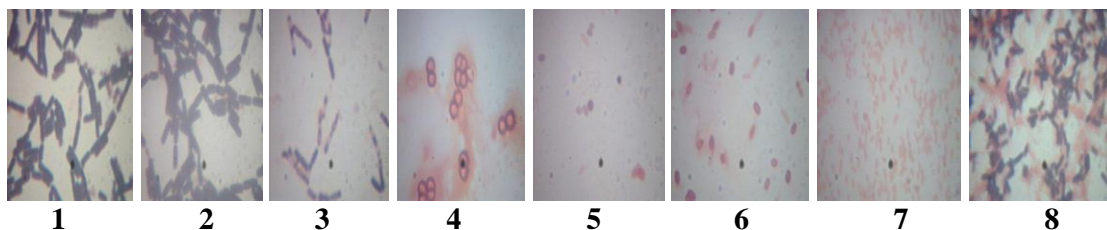
Isolasi dilakukan dari 48 contoh tanah dalam bentuk tanah rhizosfer disekitar perakaran tanaman rerumputan (*Gramineae*), yaitu jagung (*Zea mays*), tebu (*Saccharum officinarum*), rumput gajah (*Pennisetum purpureum*). Jumlah isolat yang diperoleh sebanyak 116 isolat (Tabel 1). Rhizosfer merupakan daerah yang ideal bagi tumbuh dan berkembangnya mikroba tanah. Keadaan ini didukung oleh fungsinya, yaitu sebagai penyedia nutrisi dan juga sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme. Beberapa macam nutrisi disekresikan di dalam rhizosfer, yang sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan di dalam tanah. Beberapa bakteri penyedia hara yang terdapat pada rhizosfer akar disebut sebagai rhizobakteri pemacu tanaman atau dikenal sebagai *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). PGPR dibagi menjadi dua kelompok yaitu berperan dalam siklus nutrisi dan sebagai biokontrol patogen tanaman (Bashan & Holguin, 1998). Intesitas interaksi yang besar antara rhizobakteria dan akar tanaman berada pada jarak satu cm dari permukaan akar (Tate, 2000). Dari hasil seleksi dan identifikasi meliputi uji morfologi dan pewarnaan Gram, biokimiawi diperoleh 8 isolat bakteri yang menunjukkan morfologi

yang berbeda, yaitu bentuk koloni bundar, berwarna putih, krem dan bening, serta memiliki elevasi yang cembung dan datar.

Hasil pewarnaan Gram memperlihatkan sel berbentuk batang (basil) dan bulat (kokus), ada yang bersifat Gram positif dan negatif (Gambar 1). Berdasarkan pada pedoman identifikasi bakteri (Bergey's Manual Determinative Bacteriology tahun 1994), delapan (8) isolat terpilih tersebut masing-masing menunjukkan strain *Bacillus circulans* (3 isolat) dengan kode BD2, KLB5, dan WNS3. *Azotobacter* sp (3 isolat) dengan kode KDB2, AZT4, dan KLAZ3, *Bacillus Stearothermophilus* (kode KLBN1), dan *Pseudomonas diminuta* (kode KACI).

Tabel 1. Hasil Isolasi Mikroba Rizosfer dari Beberapa Daerah di Jawa Barat dan Jawa Tengah

Asal Contoh Rizosfer	pH Tanah	Jumlah Contoh	Jumlah Isolat
<u>Wilayah Jawa Barat:</u>			
Kedungbadak (Bogor)	5,1	6	21
Cilendek (Bogor)	5,3	4	15
Ciampea (Bogor)	4,7	5	10
Cimahpar (Bogor)	5,2	5	12
Sindang Barang (Bogor)	5,3	4	8
<u>Wilayah Jawa Tengah:</u>			
Wedas Lintang (Wonosobo)	5,0	5	20
Dieng (Wonosobo)	4,8	6	18
<u>Daerah Istimewa Yogyakarta:</u>			
Bantul	5,2	8	21
Sleman	5,8	6	18
Jumlah		48	116



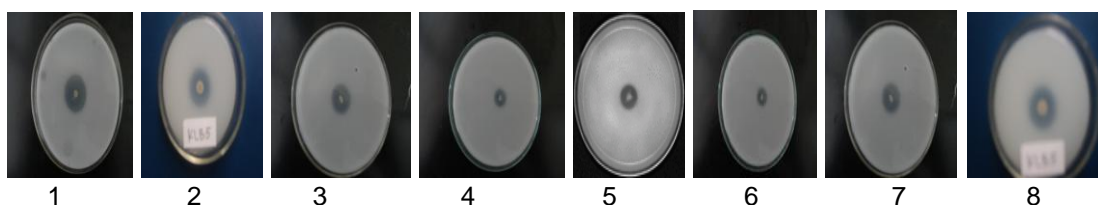
Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram dari isolat bakteri terpilih yang diisolasi pada daerah rizosfer

Keterangan :

1. *Bacillus circulans* (Isolat BD2);
2. *Bacillus circulans* (Isolat KLB5);
3. *Bacillus circulans* (Isolat WNS3);
4. *Azotobacter* sp (KDB2);
5. *Azotobacter* sp (AZT4);
6. *Azotobacter* sp (KLAZ3);
7. *Pseudomonas diminuta* (KACI);
8. *Bacillus stearothermophilus* (KLBN1).

Seleksi berdasarkan kemampuan melarutkan fosfat, dari 8 isolat terpilih, dilakukan uji pembentukkan daerah bening (*holozone*) pada medium *Pikovskaya* agar. Daerah bening (*holozone*) disekitar koloni isolat, merupakan ciri dari adanya aktivitas mikroba pelarut fosfat dalam melarutkan P terikat dalam bentuk tri kalsium fosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, seperti terlihat pada Gambar 1. Diameter (cm) dari 8 isolat bakteri terpilih, semuanya menunjukkan kemampuan dalam melarutkan P terikat yang ada didalam media *Pikovskaya* padat. Dari 8 isolat terpilih yang mempunyai diameter *holozone* terbesar adalah isolatBD2 (*Bacillus circulan*) yaitu 1,44 cm sedangkan yang terkecil adalah Isolat KLAz3 (*Azotobacter* Sp) sebesar 0,61 cm.

Menurut Sundara Rao (1994), genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* memiliki kemampuan yang paling besar dalam melarutkan fosfat tak larut menjadi bentuk larut dalam tanah. Pelarutan ini disebabkan oleh adanya sekresi asam organik bakteri tersebut seperti asam formiat, asetat, propionat, laktat, glikolat, glioksilat, fumarat, tartat, ketobutirat, suksinat dan sitrat. Jumlah P terlarut dan perubahan pH dalam medium *Pikovskaya* cair selama 8 hari rata-rata memperlihatkan adanya aktivitas bakteri pelarut fosfat yang cukup signifikan dalam melarutkan unsur P dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Pelarutan P tertinggi ditunjukkan oleh isolat *Bacillus circulan*(BD2) yaitu sebesar 91,21 mg/l. Meningkatnya pelarutan fosfat ternyata menjadikan pH semakin menurun. Hal ini disebabkan adanya proses pembebasan asam organik seperti tersebut diatas yang berakibat pada terjadinya pelarutan Ca-fosfat



Gambar 2. Hasil uji kelarutan fosfat melalui pembentukan zona bening (*holozone*) pada medium agar *Pikovskaya* dari delapan isolat bakteri rizosfer terpilih.

Keterangan :

1. *Bacillus circulan* (BD2); 2. *Bacillus Circulan* (KLB5); 3. *Bacillus Circulan* (WNS3).
4. *Azotobacter* sp (KDB2); 5. *Azotobacter* sp (AZT4); 6. *Azotobacter* sp (KLAZ3)
7. *Bacillus strearothermophilus* (KLBN1). 8. *Pseudomonas diminuta* (KACI)

Tabel 2. Ukuran Zona Bening kelarutan fosfat (P) dalam media *Pikovskaya* agar dari isolat mikroba rizosfer terpilih.

No	Nama Isolat/Kode	Strain/Galur	Ukuran zona bening (cm)
1	Isolat BD2	<i>Bacillus circulan</i>	1,32
2	Isolat KLB5	<i>Bacillus circulan</i>	1,34
3	Isolat WNS3	<i>Bacillus circulan</i>	1,20
4	Isolat KDB2	<i>Azotobacter</i> sp	1,12
5	Isolat AZT4	<i>Azotobacter</i> sp	1,00
6	Isolat KLAZ3	<i>Azotobacter</i> sp	0,61
7	Isolat KACI	<i>Pseudomonas diminuta</i>	1,27
8	Isolat KLBN1	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0,80

Tabel 3. Uji Kelarutan fosfat (P) dalam media *Pikosvkaya* cair dari isolat mikroba rizosfer terpilih

Kode Isolat/Strain	Lama Inkubasi (hari)			
	2	4	6	8
	pH P terlarut (mg/l)	pH P terlarut (mg/l)	pH P terlarut (mg/l)	pH P terlarut (mg/l)
1.BD2/ <i>Bacillus circulan</i>	5,7 67,30	5,2 78,20	4,8 88,00	4,5 91,21
2.KLB5/ <i>Bacillus circulan</i>	5,4 67,50	5,0 76,51	4,5 81,10	4,2 88,81
3 WNS3/ <i>Bacillus circulan</i>	5,8 58,21	5,5 61,54	4,8 76,00	4,6 84,53
4 KDB2/ <i>Azotobacter</i> Sp	6,0 28,43	5,5 25,33	5,2 27,32	4,8 41,00
5 AZT4/ <i>Azotobacter</i> . Sp	6,2 35,44	6,0 42,44	5,4 49,00	5,3 56,44
6. KIAZ3/ <i>Azotobacter</i> Sp	6,0 25,22	5,5 33,41	5,2 34,42	5,0 39,00
7. KAC1/ <i>Pseudomonas diminuta</i>	5,6 62,42	5,0 70,11	4,4 77,11	4,3 83,12
8. KLBN1/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,2 55,31	6,0 60,32	5,5 77,40	5,0 90,50

Hasil pengukuran fiksasi N_2 dari delapan (8) isolat terpilih dengan metode ARA menunjukkan kemampuan dari tiap-tiap isolat dalam mereduksi asetilena (menambat N_2) berbeda-beda seperti terlihat pada Tabel 4. Nilai ARA yang tertinggi diperoleh dari isolat *Azotobacter sp* (KDB2) sebesar 235,05 nmol C_2H_2 ml/jam. Bakteri penambat N_2 Pada rizosfer *graminae*, seperti *Azotobacter sp*, termasuk salah satu kelompok bakteri aerobik yang mengkolonisasi permukaan akar. *Azotobacter* merupakan bakteri penambat N_2 yang mampu menghasilkan substansi zat penacu tumbuh giberelin, sitokinin, dan asam indol asetat, sehingga pemanfaatannya dapat memacu pertumbuhan akar (Alexander, 1997).

Tabel 4. Kemampuan fiksasi N₂ isolat terpilih mikroba rizosfer berdasarkan Aktivitas Reduksi Asetilen (ARA).

No	Kode Isolat/strain	Kepekatan (Cfu/ml)	Konsentrasi Etilen (nmol C ₂ H ₂ ml/jam)
1.	BD2/ <i>Bacillus circulan</i>	2,3 x 10 ¹¹	178,00
2.	KLB5/ <i>Bacillus circulan</i>	3,1 x 10 ¹¹	172,75
3	WNS3/ <i>Bacillus circulan</i>	1,3 x 10 ¹¹	165,21
4	KDB2/ <i>Azotobacter.sp</i>	2,4 x 10 ¹¹	235,05
5	AZT4/ <i>Azotobacter. Sp</i>	2,8 x 10 ¹¹	203,00
6	KLAZ3/ <i>Azotobacter Sp</i>	2,6 x 10 ¹¹	175,50
7	KAC1/ <i>Pseudomonas diminuta</i>	2,4 x 10 ¹¹	107,00
8	KLBN1/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	3,6 x 10 ¹¹	171.20

Hasil pengukuran kadar Asam Indol Asetat (AIA) secara *in vitro* dari delapan (8) isolat terpilih menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi hormon tertinggi diperoleh pada inkubasi hari ke-8. Konsentrasi AIA tertinggi pada pengamatan hari ke-2, 4 dan 8 masing-masing dihasilkan isolat *Azotobacter sp* (KDB2) dan *Bacillus circulan* (KLB5) yaitu sebesar 70,11 µg/ml, dan 67,86 µg/ml. (Tabel 5). Hasil yang diperoleh masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil Patil (2011), Isolat *Azotobacter sp* yang diisolasi dari daerah rizosfer menghasilkan hormon tertinggi sebesar 320 µg/ml setelah diinkubasi selama 6 hari. Beberapa spesies bakteri dari genus *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan *Klebsiella* diketahui memiliki potensi menghasilkan Hormon IAA (Rosenblueth dan Martínez-Romero, 2006). Hasil penelitian Triplett (2006), menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumonia* mampu memfiksasi nitrogen dan memacu pertumbuhan tanaman gandum. Hasil analisa lainnya, menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* memiliki potensi dalam menghasilkan hormon IAA (Patten and Glick, 2002).

Tabel 5. Kandungan Hormon Pertumbuhan Asam Indol Asetat (AIA) Isolat Bakteri Rizosfer Terpilih

Kode Isolat/Strain	Konsentrasi AIA ($\mu\text{g/ml}$)		
	Hari ke-2	Hari ke- 4	Hari ke- 8
1 BD2/ <i>Bacillus circulan</i>	50,04	48,40	41,10
2 KLB5/ <i>Bacillus circulan</i>	57,08	64,50	67,86
3 WNS3/ <i>Bacillus circulan</i>	43,14	45,00	48,11
4 KDB2/ <i>Azotobacter. Sp</i>	53,00	56,04	70,11
5 AZT4/ <i>Azotobacter. Sp</i>	40,78	57,12	63,11
6 KLAZ3/ <i>Azotobacter Sp</i>	47,00	54,20	55,00
7 KAC1/ <i>Pseudomonas diminuta</i>	43, 23	43,41	44, 34
8 KLBN1/ <i>Bacillus stearrowthermophilus</i>	53,05	57,42	55,43

Delapan (8) isolat terpilih yang diinokulasikan dalam bahan pembawa (*carrier*) kompos iradiasi dan disimpan pada suhu ruang memiliki viabilitas yang cukup baik hingga bulan ke-3. Populasi awal kultur isolat-isolat tersebut berkisar 32×10^{12} - 90×10^{12} colony forming unit (*cfu*) per gram bahan pembawa. Setelah penyimpanan, populasi kultur isolat tersebut stabil maupun sedikit menurun pada kisaran 18×10^{12} - 93×10^{12} *cfu* per gram (Tabel 5). Kultur isolat *Bacillus circulans* (BD2) dan Isolat *Azotobacter* KDB2 memiliki viabilitas yang paling baik pada bahan pembawa kompos iradiasi setelah penyimpanan hingga bulan ke-3 dibandingkan dengan isolat-isolat lainnya. Populasi kultur awal isolat *Bacillus circulan* BD2 dan *Azotobacter* KDB2 yang diinokulasi pada bahan pembawa kompos iradiasi masing-masing sebesar 84×10^{12} *cfu/gr* dan 70×10^{12} *cfu/gr* menjadi 93×10^{12} *cfu/gr* dan 93×10^{12} *cfu/gr*. Kultur isolat *Azotobacter* KLAZ3 merupakan kultur isolat yang mengalami penurunan populasi yang paling banyak dari populasi awal sebesar 58×10^{12} *cfu/gr* menjadi 28×10^{12} *cfu/gr*. Hasil tersebut menggambarkan konsorsium bakteri mampu bertahan hidup pada media bahan pembawa kompos iradiasi.

Tabel 6. Viabilitas isolat rizosfer selama penyimpanan dalam bahan pembawa kompos iradiasi

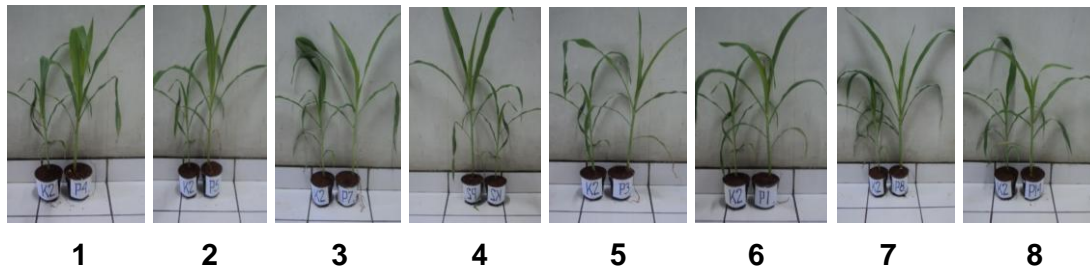
No	Nama Isolat	Viabilitas (<i>cfu/gr</i>)		
		0 hari	1 bulan	3 bulan
1	<i>Bacillus circulan</i> (BD2)	84×10^{12}	68×10^{12}	93×10^{12}
2	<i>Bacillus circulan</i> (KLB5)	95×10^{12}	60×10^{12}	75×10^{12}
3	<i>Bacillus circulan</i> (WNS3)	94×10^{12}	70×10^{12}	64×10^{12}
4	<i>Azotobacter sp</i> (KDB2)	70×10^{12}	78×10^{12}	84×10^{12}
5	<i>Azotobacter sp</i> (AZT4)	69×10^{12}	62×10^{12}	59×10^{12}
6	<i>Azotobacter sp</i> (KLAZ3)	58×10^{12}	31×10^{12}	28×10^{12}
7	<i>Bacillus stearrowthermophilus</i> (KLBN1)	32×10^{12}	12×10^{12}	18×10^{12}
8	<i>Pseudomonas diminuta</i> (KAC1)	90×10^{12}	94×10^{12}	91×10^{12}

Hasil pengujian efektivitas dari delapan (8) isolat terhadap tanaman jagung (Tabel 7) menunjukkan bahwa inokulan yang mengandung isolat *Azotobacter* sp (KDB2) adalah yang terbaik dalam memacu pertumbuhan jagung. Hal ini terlihat pada kenaikan tinggi tanaman dan bobot biomasa basah yang secara statistik berbeda nyata dengan kontrol negatif (tanpa inokulasi dan pupuk) dan kontrol positif (50% kompos dan 50% NPK). Persentasi kenaikan tinggi tanaman per pot (cm) sebesar 70,64% dibandingkan dengan tanaman kontrol negatif dan 37.61% dibandingkan dengan tanaman kontrol positif. Sedangkan persentasi kenaikan berat biomasa tanaman (gr) sebesar 90,55% bila dibandingkan dengan kontrol negatif dan 57,60% dibandingkan dengan kontrol positif. Perbedaan ini dapat dilihat juga pada Gambar 3. Dari hasil percobaan ini terlihat bahwa inokulan kompos iradiasi dengan isolat tunggal jenis *Azotobacter* sp KDB2 efektif mampu memacu pertumbuhan tanaman jagung. Perlu pengembangan lebih lanjut, pembuatan inokulan berbasis kompos iradiasi yang mengandung bioaktif dengan formulasi konsorsia isolat mikroba rizosfer yang berbeda, sehingga efektivitasnya lebih baik untuk meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman.

Tabel 7. Nilai Rata-rata Tinggi dan berat biomasa basah Tanaman Jagung Umur 35 hari yang diinokulasi dengan delapan (8) isolat terpilih.

No	Inokulan	Tinggi (cm)	Berat Biomassa (gr)
1	Tanpa pupuk (kontrol)	54,50± 2,12 a	2.28±0,45 a
2	50%NPK+50%Kompos	72.50± 7,78 bc	10.16± 0,89 b
3	<i>Bacillus circulans</i> (BD2)	83.50± 0,71 d	12.60± 0,014 c
4	<i>Bacillus circulans</i> (KLB5)	82.14± 6,36 de	10.60± 0,028 b
5	<i>Bacillus circulans</i> (WNS3)	83.50± 3,54 cd	12,60± 0,07 c
6	<i>Azotobacter</i> sp (KDB2)	93,00 ± 1,41 e	24.14± 0,014 f
7	<i>Azotobacter</i> sp (KIAz3)	80.50± 0,71 c	18,29± 0,06 d
8	<i>Azotobacter</i> sp (AZT4)	85.00± 1,41 d	22.22± 0,49 e
9	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (KLBNI)	86.50± 4,95 d	22,16± 0,028 e
10	<i>Pseudomonas diminuta</i> (KACI)	72.00± 5,66 b	12,65± 0,098 c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.



Gambar 3. Pengaruh inokulan mikroba rhizosfer terhadap pertumbuhan jagung setelah 35 hari setelah tanam (HST).

Keterangan :

1. Tanaman jagung P4 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus circulans* (BD2) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
2. Tanaman jagung P5 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus circulans* (KLB5) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
3. Tanaman jagung P7 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus circulans* (WNS3) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
4. Tanaman jagung P2 (sebelah kiri) yang diberi inokulan dengan isolat *Azotobacter sp* (KDB2) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
5. Tanaman jagung P3 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *Azotobacter sp* (KLAZ3) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
6. Tanaman jagung P1 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *Azotobacter sp* (AZT4) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
7. Tanaman jagung P8 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *Bacillus stearothermophilus* (KLBN1) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).
8. Tanaman jagung P14 (sebelah kanan) yang diberi inokulan dengan isolat *pseudomonas diminuta* (KACI) dan yang diberi 50% kompos+50%NPK (Kontrol)(K2).

KESIMPULAN

Hasil Isolasi mikroba rizosfer dari 48 contoh tanah Jawa Barat dan Jawa Tengah diperoleh 116 isolat. Dari hasil seleksi didapatkan delapan (8) isolat potensial. Berdasarkan hasil identifikasi sampai tingkat spesies, maka kedelapan isolat itu masing-masing menunjukkan strain *Bacillus circulans* (3 isolat) dengan kode BD2, KLB5, dan WNS3, *Azotobacter sp* (3 isolat) dengan kode KDB2, KLAz3, dan AZT4, *Bacillus stearothermophilus* dengan kode KLBN1, dan *Pseudomonas diminuta* dengan kode KACI.

Semua Isolat terpilih mempunyai kemampuan melarutkan fosfat, menghasilkan hormon pertumbuhan Asam Indol Asetat (AIA), dan memfiksasi N_2 . Kemampuan pelarutan fosfat yang tertinggi diperoleh isolat BD2 (*Bacillus circulans*) yaitu sebesar 91,21 mg/l dengan ukuran zona bening dalam medium *Pikovskaya* 1,42 cm. Kemampuan produksi hormon AIA yang paling tinggi dicapai isolat *pseudomonas diminuta* (kode KACI) yaitu sebesar 74,34 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan Kemampuan fiksasi N_2 tertinggi dicapai isolat *Azotobacter sp* (kode KDB2) yaitu sebesar 235,05 nmol/jam.

Hasil uji viabilitas isolat terpilih dalam bahan pembawa kompos iradiasi, menunjukkan kestabilan meskipun mengalami sedikit penurunan setelah penyimpanan selama 3 bulan. Hasil tersebut menggambarkan konsorsium bakteri mampu bertahan hidup pada media pembawa kompos iradiasi.

Hasil uji efektivitas inokulan terhadap tanaman jagung pot menunjukkan, isolat mampu meningkatkan pertumbuhan dibanding kontrol negatif dan positif. Inokulan yang mengandung isolat *Azotobacter* KDB2 merupakan inokulan terbaik sebagai bahan aktif Pupuk Organik Hayati (POH).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Sdr. Marwadi yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander M. 1997. Introduction to Soil microbiology. New York: John Wiley & Sons., pp.333-349.
- Bashan, and Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth Promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soi BiolBiochem* 30:(8,9):1225-1228 <http://periodicals.faqs.org/201003/2013071231.html#ixzz1eP1t03X0.3>
- Bricc, J.M. and Silverstone, S.E. 1991. Rapi In Situ Assay for Indole Acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 57. No.2: 535-538.
- Cattelan, A.J., P.G. Hartel, and J.J. Fuhrmann. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil.Sci.Soc.Am.J.* 63: 1.670-1.680.
- Cuningham, J.E. and C. Kuyak. 1992. Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *penicillium billai*. *App. Environ. Microbiol.* 58:1451-1458.
- D.H. Bergeys and John G. Holt. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore : Williams & Wilkins. USA.
- Gaur, A.C. 1981. Phosphomicroorganisms and varians transformation in compost technology. FAO Project Field document No.13.Rome.
- Glick, BR. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *J. Microbiol* 41: 109-114.
- Gordon A.S. & Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid Plant. *Physiol.* 26:192–195.
- Mulyana, N. dan Sudrajat, D. 2010. Formulasi Konsorsia Mikroba Rhizosfer untuk Meningkatkan Pertumbuhan dan Produktivitas Tanaman Jagung Manis (*Zea mays Sachararata* Sturt) (Belum dipublikasikan).
- Patten, C.,and Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the hostplant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795–3801.
- Razie, F. dan Iswandi Anas. 2005. Potensi *Azotobacter* Spp (dari Lahan Pasang Surut Kalimantan) Dalam Menghasilkan *Indole Acetic Acid (IAA)*. *Jurnal Tanah dan Lingkungan*, Vol 7 No. 1 April 2005 : 35-39.
- Roasenblueth, M. dan Martinez-Romero,E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *The American Phytopathological Society*. MPMI Vol.19, No. 8:827–837.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1985. Methods in legume *Rhizobium* technology. Hawaii: Niftal Project; Mircen, 367p.
- Subharao, N.S. 1982. Biofertilizer in Agriculture. Oxford and IBH Publishing.
- Sundara, W. V. B. and Sinha, M. K. 1963, Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian J. Agric. Sci.*, 33, 272–278.
- Tate, R.L. 2000. Soil Microbiology, p. 149-152. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Triplett, E. W. 2006. Nitrogen Fixation in Wheat by *Klebsiella pneumonia*. 342 <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpa ges/2 04253.html>.

- Turner G.I and A.H. Gibson. 1980. *Measurement of nitrogen fixation by indirect means*. In: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. F.J. Bergensen (Ed.) New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Wedhastri, S. 2002. Isolasi dan seleksi *Azotobacter* spp. penghasil faktor tumbuh dan penambat nitrogen dari tanah masam. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*. 3:45-51.