



BAKTERI PELARUT FOSFAT

Hanna Artuti



FOSFAT (P)

- Fosfat merupakan salah satu unsur makro esensial, tidak hanya bagi kehidupan tumbuhan tetapi juga bagi biota tanah.
- Aktivitas mikrob tanah berpengaruh langsung terhadap ketersediaan fosfat di dalam larutan tanah.
- Sebagian aktivitas mikrob tanah dapat melarutkan fosfat dari ikatan fosfat tak larut (melalui sekresi asam-asam organik) atau mineralisasi fosfat dari bentuk ikatan fosfat-organik menjadi fosfat-anorganik



Mineralisasi Fosfat

- Fosfat di dalam tanah secara alami terdapat dalam bentuk organik dan anorganik. Kedua macam bentuk tersebut merupakan bentuk fosfat yang tidak larut atau sedikit larut, sehingga ketersediaannya bagi biota tanah sangat terbatas.
- Mineral fosfat anorganik pada umumnya terikat sebagai $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (variscite) dan $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (strengite) pada tanah masam dan sebagai $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (trikalsium fosfat) pada tanah basa → ini yg umum terjadi



Mikrob pelarut fosfat (MPF)

- Mikrob tanah seperti **bakteri** *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, dan *Xanthomonas*, serta fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Culfularia* dan golongan **fungi** Aktinomesetes (*Streptomyces*) mempunyai kemampuan melarutkan fosfat-anorganik tak larut dengan mensekresikan asam² organik (Subba-Rao, 1982).
- Setiap mikrob pelarut fosfat (MPF) menghasilkan jenis dan jumlah asam organik yang berbeda dan ada kemungkinan satu jenis MPF menghasilkan lebih dari satu jenis asam organik (Adu-Tae, 2004).
- Kemampuan asam organik melarutkan fosfat menurun dengan menurunnya konstanta stabilitas (log K) menurut urutan sebagai berikut: asam sitrat > oksalat > tartat > malat > laktat > glukonat > asetat > format.

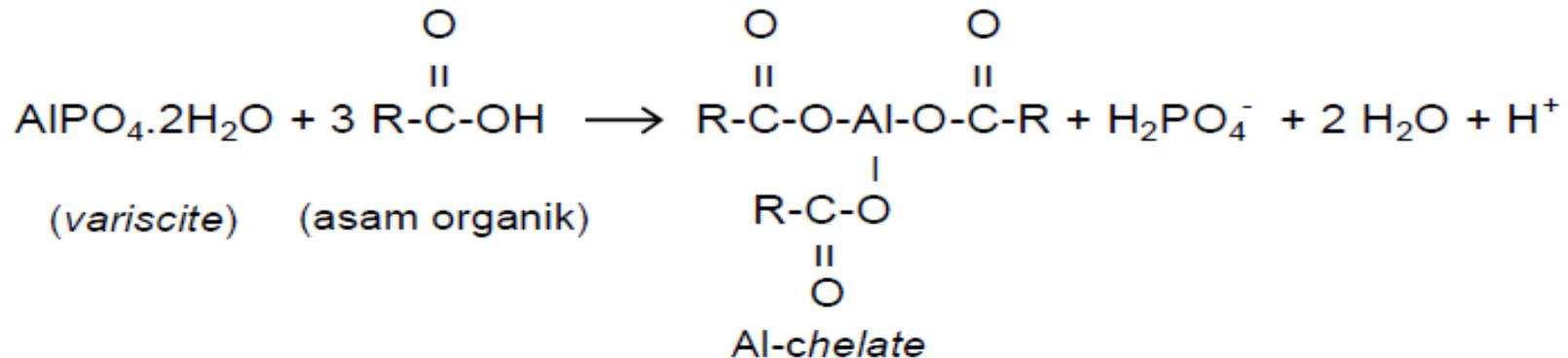


Bakteri pelarut fosfat (BPF)

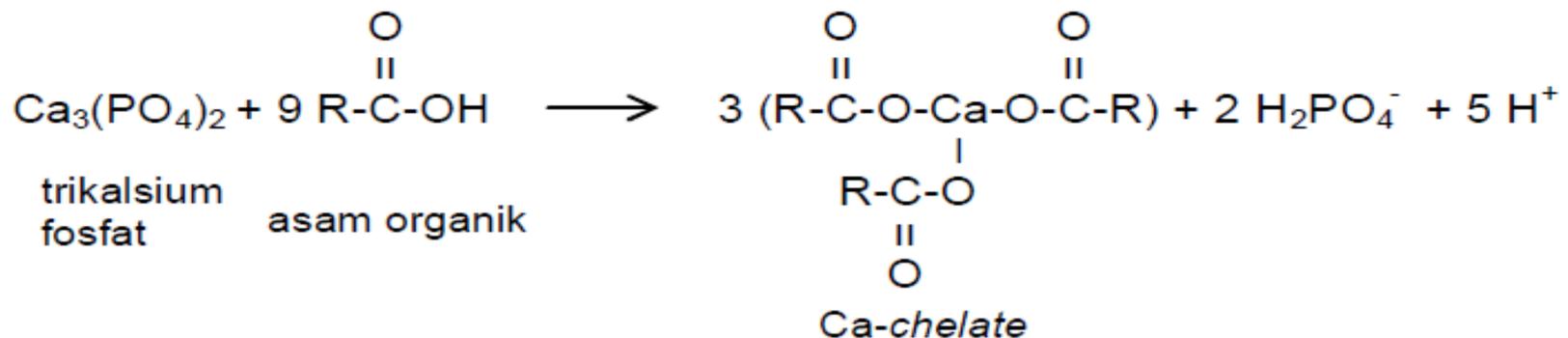
- Bakteri pelarut fosfat mampu mensekresikan enzim fosfatase yang berperan dalam proses hidrolisis P organik menjadi P anorganik dan juga bakteri pelarut fosfat dapat menghasilkan zat pengatur tumbuh.
- Bakteri yang berperan sebagai pelarut fosfat pada tanah telah banyak ditemukan, di antaranya berasal dari genus *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Mycrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, dan *Flovobacterium* (Purwaningsih, 2003).



Pelarutan fosfat dari Al-P atau Fe-P pada tanah masam oleh asam organik yang dihasilkan MPF sebagai berikut:



Sedangkan reaksi pelarutan fosfat dari Ca-P pada tanah basa oleh asam organik sebagai berikut:





Bakteri pelarut fosfat (BPF)

- Beberapa jenis bakteri sangat efektif melarutkan fosfat dari batuan fosfat maupun residu fosfat dalam tanah → *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* telah dibuat formulanya dalam bentuk inokulan **phosphobacterin**. Inokulan ini berhasil digunakan untuk peningkatan P-tersedia pada tanah-tanah di Uni Soviet tetapi gagal digunakan di Amerika Serikat (Mullen, 1998) → artinya kemampuan MPF sangat beragam tergantung dari jenis, daya adaptasi, dan kemampuan hidup pada lingkungan yang berbeda.
- Oleh karena itu penelitian dan pemanfaatan MPF unggul yang sesuai dengan berbagai agroekosistem lahan pertanian atau kehutanan yang lebih spesifik masih sangat diperlukan.



Isolasi BPF

- ③ **Kemampuan BPF** dalam melarutkan fosfat berbeda-beda, antara lain tergantung dari **macam dan jumlah asam organik** yang dihasilkan serta **sumber fosfat yang digunakan**.
- ③ Semua biota tanah memerlukan fosfat sehingga pemberian fosfat dari sumber fosfat yang sukar larut pada suatu media akan menyebabkan tidak semua jenis mikroba dapat tumbuh/membentuk koloni pada media tersebut.
- ③ Koloni yang tumbuh hanya berasal dari pertumbuhan/perbanyakan mikroba yang dapat melarutkan fosfat dari sumber fosfat yang terkandung dalam media.
- ③ Hal ini menyebabkan terjadinya penyeleksian bagi pertumbuhan mikroba, sehingga sering disebut sebagai media selektif BPF.



Isolasi BPF

- Media selektif BPF yang biasa digunakan untuk isolasi adalah media agar **Pikovskaya** → BPF yang tumbuh pada media ini akan membentuk koloni yang di sekelilingnya terdapat daerah bening (*zona bening*).
- Daerah bening ini terbentuk karena adanya pelarutan fosfat dari sumber fosfat sukar larut yang ada dalam media oleh asam-asam organik yang dihasilkan koloni mikrob.
- Pada dasarnya semakin luas dan semakin jernih pembentukan daerah bening, secara kualitatif menunjukkan semakin tinggi kelarutan fosfat dalam media, sehingga koloni tersebut dapat dipilih/diisolasi sebagai isolat/strain BPF yang mempunyai potensi untuk dapat dikembangkan lebih lanjut.



Isolasi BPF

- Media Pikovskaya bisa dimodifikasi sesuai dengan tujuan isolasi → Sebagai contoh, untuk memperoleh strain BPF yang mampu melarutkan fosfat dari Al-P maka pada media digunakan AlPO_4 sebagai sumber fosfat → isolat BPF berpotensi untuk dapat dikembangkan pada tanah masam dengan kadar Al relatif tinggi.
- Demikian pula jika yang dipakai sebagai sumber fosfat adalah FePO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ atau batuan fosfat lainnya (terdapat berbagai macam batuan fosfat: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$, dan lainnya), maka koloni yang tumbuh merupakan koloni BPF yang mampu memanfaatkan fosfat dari senyawa sumber fosfat tersebut.



Alat untuk isolasi BPF

- 1) Neraca analitik ketelitian dua desimal
- 2) Labu Erlenmeyer 1 L
- 3) Cawan Petri steril
- 4) Tabung reaksi steril
- 5) Pipet mikro 1 ml



Bahan isolasi BPF → Media agar Pikovskaya (Subba-Rao, 1981)

Timbang bahan kimia berikut ini:

- 1) 10 g glukosa;
- 2) 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bisa diganti dengan AlPO_4 , Fe PO_4 , atau sumber P lainnya);
- 3) 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 4) 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 5) sedikit MnSO_4 ;
- 6) sedikit FeSO_4 ;
- 7) 0,5 g ekstrak ragi; dan
- 8) 15 g agar.

→ Dilarutkan dalam akuades sampai volume 1 L.



Cara kerja pembuatan media Pikovskaya:

- Sterilisasi bahan media tersebut dengan autoklaf pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit.
- Keluarkan media yang telah disterilkan dan dinginkan (didiamkan) sampai suhu mencapai + 45– 50°C (hangat-hangat kuku).
- Tuang secara aseptik sebagian media (+ 600 mL) ke dalam cawan-Petri steril (+ 15 mL media pada setiap cawan Petri), goyang/geser supaya permukaan media merata, dan diamkan sampai beku.
- Media ini merupakan media agar Pikovskaya untuk penanaman/isolasi MPF.



Lanjutan cara kerja pembuatan media:

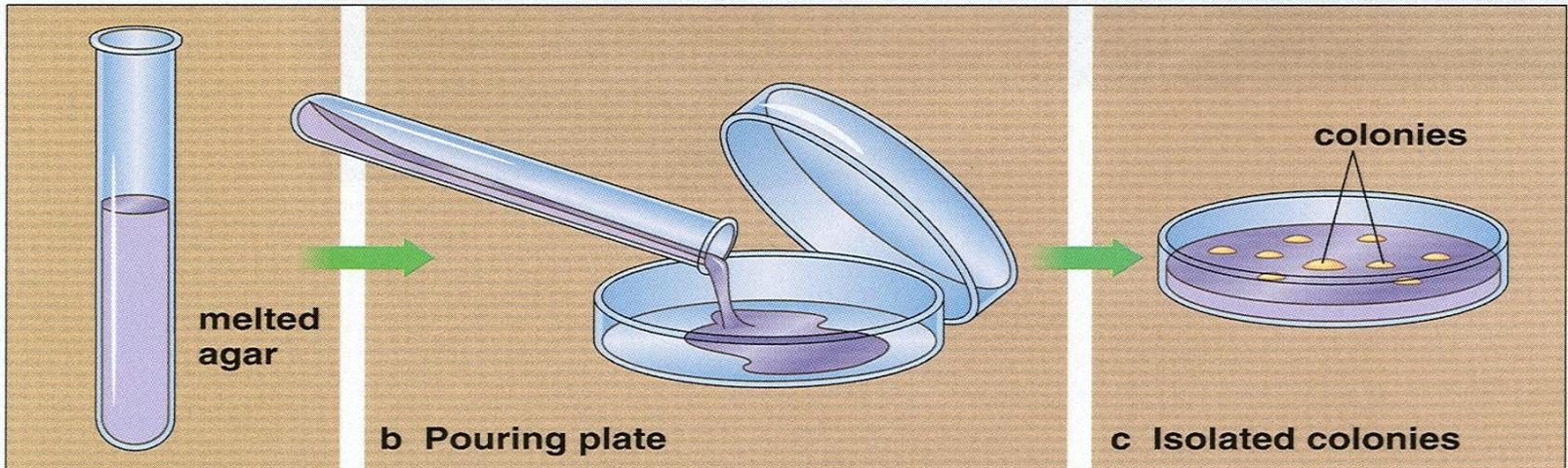
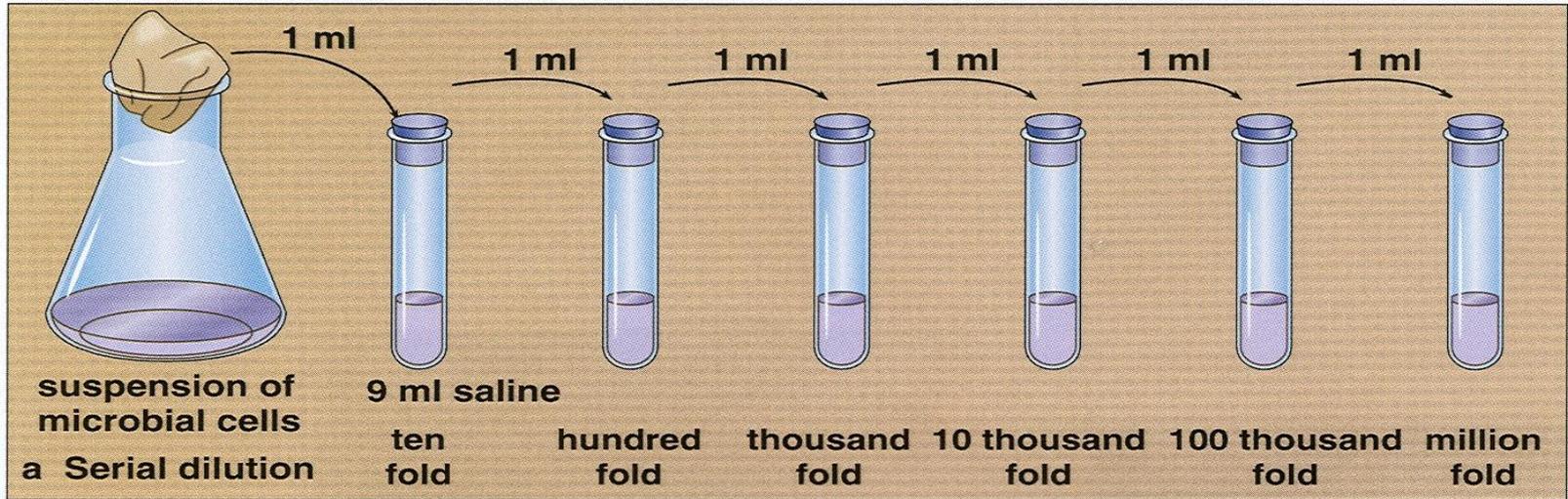
- ③ Tuang secara aseptik sebagian media (+ 400 mL) ke dalam tabung reaksi steril (+ 15 mL media setiap tabung), letakkan pada posisi miring dengan sudut 30° dan diamkan sampai dingin. Media ini merupakan media agar Pikovskaya miring untuk menyimpan biakan murni BPF.
- ③ Biosida (pilih salah satu):
- ③ Fungisida:
 - *Brilliant green* (1,25 ppm);
 - *Pentachloronetrobenzene*: Larutkan 0,5 g *pentachloronetrobenzene* dalam 100 mL aseton, untuk 40 mL media.
- ③ Bakterisida:
 - Karbenisilin (50 ppm)
 - Tetrasiklin (50 ppm)



Prosedur kerja isolasi BPF

- Larutkan 1 g contoh tanah ke dalam 9 ml akuades steril.
- Buat deret pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} .
- Tambahkan biosida (fungisida untuk isolasi bakteri atau bakterisida untuk isolasi fungi) pada setiap deret pengenceran larutan tersebut.
- Pipet masing-masing 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} dan secara aseptik tuang ke dalam cawan Petri yang berisi media agar Pikovskaya, goyang (cawan Petri diletakkan di atas permukaan meja kemudian digeser ke kanan dan ke kiri atau digeser memutar) sampai larutan merata di seluruh permukaan media.
- Beri label pada setiap cawan Petri sesuai dengan besar pengenceran, selanjutnya inkubasi pada suhu kamar selama 3-6 hari.

Pour Plate

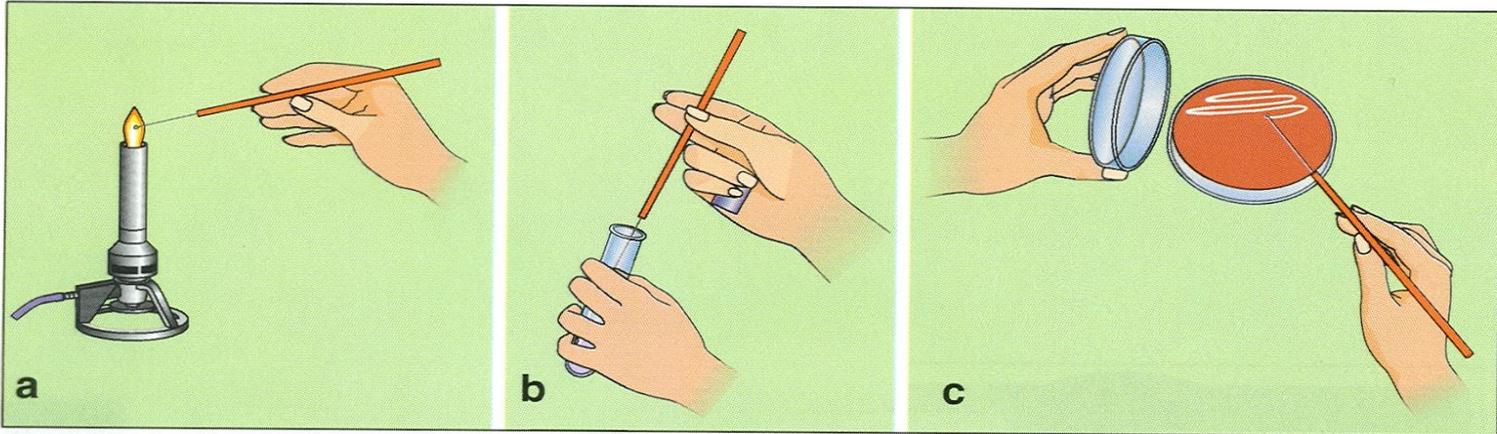




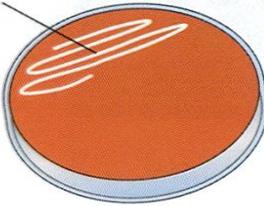
Lanjutan prosedur kerja isolasi BPF

- Amati pertumbuhan koloni MPF setelah 3-6 hari inkubasi, pilih koloni yang mempunyai zona bening (*halozone*) paling lebar dan paling jernih untuk diisolasi.
- Secara aseptik ambil koloni yang telah dipilih dengan ose steril, goreskan pada media agar, dan inkubasi pada suhu kamar selama 3-6 hari.
- Koloni yang tumbuh terpisah, ambil secara aseptik dengan ose dan goreskan ke permukaan media agar miring Pikovskaya.
- Beri kode/nomor isolat pada setiap isolat MPF dan simpan di dalam alat pendingin (refrigerator) pada suhu 5°C. Tabung ini berisi biakan murni isolat MPF yang digunakan sebagai sumber inokulan.

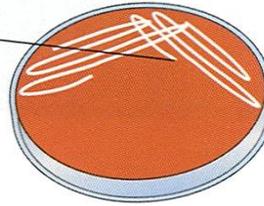
Streak Plate



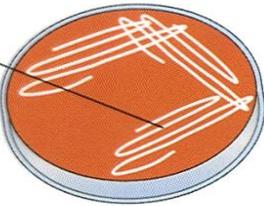
initial inoculum



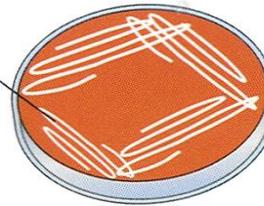
second set of streaks



third set of streaks



fourth set of streaks



d



e

Courtesy Becton Dickinson Microbiology Systems

Koloni Bakteri Hasil Isolasi





Karakterisasi BPF

Prinsip

Zona bening (*halozone*) merupakan tanda awal untuk mengetahui kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat. Semakin lebar zona bening, secara kualitatif dapat dianggap sebagai tanda kemampuan MPF melarutkan fosfat dalam media tumbuh semakin besar. Demikian pula semakin bening/terang zona bening menunjukkan pelarutan fosfat semakin intensif. Lebar/garis tengah koloni dan zona bening bisa diukur, pada umumnya semakin besar nilai perbandingan antara garis tengah zona bening: garis tengah koloni, menunjukkan kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat secara kualitatif semakin besar, walaupun hal ini belum cukup untuk menggambarkan kemampuan MPF dalam pelarutan fosfat yang sebenarnya (Nautiyal, 1999).



Karakterisasi BPF

Pengujian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat MPF yang telah diisolasi dalam melarutkan fosfat terutama pada media Pikovskaya cair. Di dalam media Pikovskaya cair, sel-sel MPF memanfaatkan nutrisi yang ada dalam media untuk membelah dan berkembang. Pada waktu pembelahan sel, terjadi pembentukan sel-sel baru sehingga MPF membutuhkan fosfat relatif besar. Oleh karena itu pada waktu yang bersamaan MPF menghasilkan asam-asam organik untuk melarutkan fosfat. Kadar fosfat terlarut yang tidak diimobilisasi kembali oleh MPF bisa langsung diukur secara kolorimetri dengan pewarnaan biru molibden.



Karakterisasi BPF

Untuk memastikan MPF yang diperoleh tidak bersifat patogen perlu dilakukan uji patogenisitas secara kualitatif. Uji patogenisitas dilakukan dengan mengamati (membandingkan) secara visual pertumbuhan tanaman pada media tertentu yang diberi perlakuan inokulasi MPF *nonpatogen*, patogen, dan kontrol (tanpa inokulasi). Pada tanaman yang diinokulasi MPF patogen akan memperlihatkan pertumbuhan yang tidak normal (sakit). Peneliti lain menggunakan tanaman tembakau yang merupakan tanaman hipersensitif terhadap pengaruh patogen untuk pengujian patogenisitas mikroba.

Karakterisasi BPF → Pengukuran zona bening

Bahan dan alat

- Kaca pembesar
- Penggaris
- Hasil penanaman (koloni) MPF dalam cawan Petri

Posedur

- Amati pertumbuhan koloni MPF dalam cawan Petri dari hasil penanaman pada 2.6.1 (lihat Gambar 1).
- Ukur garis tengah koloni dan garis tengah zona beningnya dengan penggaris dan dengan bantuan kaca pembesar pada koloni yang disertai zona bening. Lakukan pengukuran garis tengah koloni dan zona bening sebanyak 2-3 kali pada posisi yang berbeda, hasil pengukuran dirata-rata.
- Hitung:
 - Lebar zona bening = garis tengah zona bening – garis tengah koloni.
 - Rasio zona bening/koloni = garis tengah zona bening: garis tengah koloni.
- Koloni yang mempunyai nilai rasio tinggi merupakan isolat MPF yang mempunyai peluang untuk dapat dikembangkan/dimanfaatkan lebih lanjut.



Gambar 1. Beberapa koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) tumbuh pada media selektif agar Pikovskaya yang membentuk zona bening dengan kejernihan dan diameter yang berbeda-beda



Karakterisasi BPF → Uji pelarutan P

Alat

- Neraca analitik ketelitian tiga desimal
- Labu Erlenmeyer 500 ml dan 250 ml.
- Biakan murni MPF
- Tabung reaksi berisi 10 ml akuades steril
- Mikropipet 1 ml
- Penggoyang (*shaker*)
- Kertas saring Whatman No. 1 atau 42.
- Pipet 5 ml.
- Sentrifus.
- Tabung plastik sentrifugase ukuran 50 ml.
- Spektrofotometer UV-VIS

Karakterisasi BPF → Uji pelarutan P

Bahan kimia

- Media Pikovskaya cair (lihat 2.6.1, tanpa agar).
- Pereaksi P pekat.
 - Larutkan 12 g ammonium molibdat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ dengan 100 ml akuades dalam labu ukuran 1 L.
 - Tambahkan 0,277g kalium antimonil tartrat $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}]$, tambah akuades menjadi 1 L, kocok.
- Pereaksi pewarna P pekat
 - Campurkan 0,53 g asam askorbat dengan 50 ml pereaksi P pekat.
 - Pereaksi ini harus selalu baru.
- Standar pokok 1.000 ppm PO_4^{3-} (titrisol).
 - Pindahkan larutan standar induk titrisol secara kuantitatif ke dalam labu ukur 1 L, tambah akuades sampai tepat pada garis batas, dan kocok.
- Standar 50 ppm PO_4^{3-} .
 - Pipet 5 ml standar 1.000 ppm PO_4^{3-} ke dalam labu ukur 100 ml, tambah akuades sampai pada garis batas, dan kocok.
- Standar 2,5 ppm PO_4^{3-} .
 - Pipet 5ml standar 50 ppm PO_4^{3-} ke dalam labu ukur 100 ml, tambah akuades sampai pada garis batas, dan kocok.
- Deret standar PO_4^{3-} (0-2,5 ppm).
 - Pipet berturut-turut 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; dan 5 ml standar 2,5 ppm PO_4^{3-} ke dalam tabung reaksi.
 - Tambah akuades sampai masing-masing menjadi 5 ml, kocok.
 - Kepekatan deret standar berturut-turut adalah: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 ppm PO_4^{3-} .

Cara kerja → Uji pelarutan P



- Panaskan 500 ml media Pikovskaya cair sampai semua bahan bercampur, bagi ke dalam lima buah labu Erlenmeyer ukuran 250 ml (tiap labu Erlenmeyer diisi 100 ml media), tutup dengan kapas, dan sterilkan seperti pada 2.6.1.2.
- Secara aseptik tuang 10 ml akuades steril ke dalam tabung biakan murni (dari hasil isolasi pada 2.6.1.2), kocok dengan stirer selama 1 menit.
- Secara aseptik pipet 1 ml suspensi dan masukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang telah diisi media Pikovskaya cair, tutup rapat, dan goyang dengan penggoyang pada 100 rpm selama 1-2 minggu. Dengan cara yang sama lakukan pada labu Erlenmeyer berisi Pikovskaya cair yang tidak diinokulasi MPF sebagai perlakuan kontrol.
- Saring 20 ml biakan dengan kertas saring (Whatman No. 1 untuk bakteri atau Whatman No. 42 untuk fungi).
- Masukkan filtrat ke dalam tabung sentrifusi, sentrifus pada 1.000 rpm selama 15 menit.

Cara kerja (lanjutan) → Uji pelarutan P



- Pipet 5,0 ml supernatan, tuang ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 ml pereaksi P pekat, kocok beberapa menit, dan diamkan 30 menit.
- Ukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm. Dengan cara yang sama lakukan pada labu Erlenmeyer berisi media Pikovskaya cair yang tidak diinokulasi MPF sebagai perlakuan kontrol.
- Buat grafik kalibrasi dari deret larutan standar PO_4 . Tambah 0,5 ml pereaksi P pekat pada masing-masing deret standar, kocok beberapa menit, dan diamkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm.
- Jika ternyata intensitas warna dari filtrat biakan murni yang diukur melebihi absorbansi dari larutan standar 2,5 ppm PO_4 , encerkan filtrat dengan menambahkan akuades sampai intensitas warna pada kisaran warna larutan standar.



Cara kerja (lanjutan) → Uji pelarutan P

Perhitungan

Kadar PO_4 (ppm) = ppm kurva x fp

Keterangan:

- ppm kurva = kadar contoh yang diperoleh dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi blanko.
- fp = faktor pengenceran (bila ada)

Kadar PO_4 isolat MPF (ppm) = ppm kurva x fp – kadar PO_4 kontrol



Uji patogenisitas

Bahan dan alat

- Bahan kimia untuk media Yosida (NH_4NO_3 , NaH_2PO_4 , K_2SO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, H_3BO_3 , ZnSO_4 , CuSO_4 , FeCl_3 , dan akuades).
- Biji padi (30 – 50 biji)
- Neraca analitik ketelitian tiga desimal.
- Labu Erlenmeyer 500 ml.
- Cawan Petri steril.
- Tabung reaksi steril ukuran $\phi = 3-4$ cm, tinggi =30 cm.
- Biakan murni MPF
- Pipet mikro 1 ml.
- Alkohol 46%
- HgCl_2 0,2 %



Uji patogenisitas

Prosedur

- Buat media Yosida *et al.* (1976), timbang bahan kimia untuk membuat larutan stok, sebagai berikut:

Hara	Bahan kimia	Berat (g L ⁻¹)
Hara makro (masing-masing bahan dilarutkan secara terpisah)		
▪ N	NH ₄ NO ₃	80,0
▪ P	NaH ₂ PO ₄	40,3
▪ K	K ₂ SO ₄	71,4
▪ Ca	CaCl ₂	88,6
▪ Mg	MgSO ₄	32,4
Hara mikro (semua bahan dicampur/disatukan)		
▪ Mn	MnCl ₂	1,5
▪ Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,074
▪ B	H ₃ BO ₃	0,93
▪ Zn	ZnSO ₄	0,035
▪ Cu	CuSO ₄	0,031
▪ Fe	FeCl ₃	7,7



Uji patogenisitas

Untuk pembuatan 4 L media, campurkan stok larutan dari masing-masing hara sebagai berikut:

Hara	Volume stok larutan (ml)	Kadar hara (ppm)
N	5	40
P	5	10
K	5	40
Ca	5	40
Mg	5	40
Hara Makro	5	

Tambah akuades sampai volume 4 L.

- Panasi larutan bahan tersebut sampai semua bahan bercampur, dibagi ke dalam lima buah tabung reaksi (tiap tabung diisi 100 - 150 ml).
- Masukkan kapas ke dalam tabung sampai tepat di permukaan larutan, tutup tabung dengan kapas, dan sterilkan dengan autoklaf pada tekanan 0,1 Mpa dan suhu 121°C selama 20 menit.
- Keluarkan media dan diamkan sampai dingin.

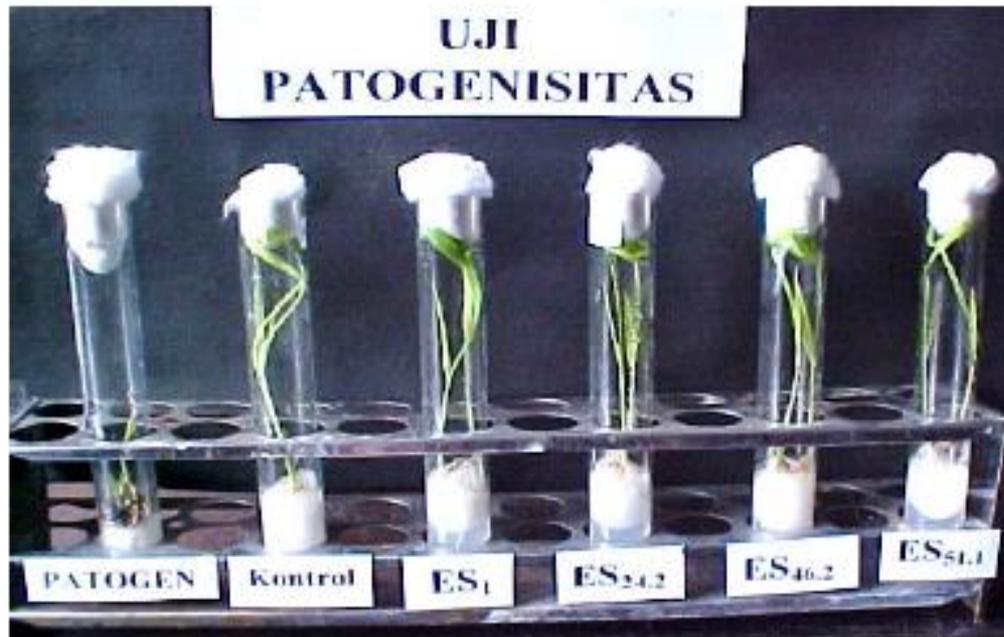


Uji patogenisitas

- Pilih beberapa biji padi yang mempunyai persentase tumbuh $\geq 80\%$.
- Lakukan sterilisasi permukaan kulit pada beberapa biji padi terpilih, yaitu: rendam biji padi tersebut di dalam alkohol 46% selama 1 menit, pindahkan ke dalam akuades steril tiga kali masing-masing 10 menit, pindahkan ke dalam 0,2 % HgCl_2 selama 2 menit, pindahkan/celupkan ke dalam akuades steril enam kali, dan rendam di dalam akuades steril selama 5 jam.
- Secara aseptik sebar/semai biji-biji padi ke dalam cawan Petri yang berisi kapas basah steril dan diamkan selama 2 – 4 hari pada suhu kamar sampai batang dan akar tumbuh sepanjang ± 1 cm.
- Secara aseptik masukkan 1 - 2 kecambah ke dalam tabung yang telah diisi media Yosida steril.
- Secara aseptik masukkan (inokulasikan) 1 ml biakan murni MPF ke dalam tabung (2-3 tabung) dan inkubasi selama 2 - 3 minggu di ruang penumbuh (*growth room*) atau di ruang yang pada saat tertentu tersinari matahari. Dengan cara yang sama inokulasikan mikroba patogen ke dalam tabung lain dan kontrol (tanpa inokulasi) sebagai pembandingan.
- Secara visual amati ada tidaknya pertumbuhan tanaman yang tidak normal. Tanaman yang sehat menandakan bahwa MPF tersebut bukan sebagai mikroba patogen, sedangkan tanaman yang mempunyai tanda-tanda sakit atau pertumbuhan terhambat disebabkan oleh mikroba patogen (Gambar 2).



Uji patogenisitas



Gambar 2. Pengujian sifat patogen dari beberapa isolat mikroba pelarut fosfat pada tanaman padi dengan menggunakan media Yosida, paling kiri merupakan isolat fungi patogen



Enumerasi

Prinsip

Kepadatan populasi MPF di dalam tanah dipengaruhi oleh banyak faktor. Penghitungan populasi secara langsung dengan memakai mikroskop (menggunakan hemositometer) hanya dimungkinkan untuk populasi dalam biakan murni, tetapi tidak dimungkinkan bagi populasi MPF di dalam tanah, karena tidak semua sel mikroba dalam tanah mampu melarutkan fosfat. Penghitungan populasi hanya bisa dilaksanakan secara tidak langsung yaitu dengan menghitung koloni dari pertumbuhan setiap sel MPF pada media selektif agar Pikovskaya (*plate count*) atau dengan metode penghitungan jumlah yang paling mungkin (*most probable number* = MPN).

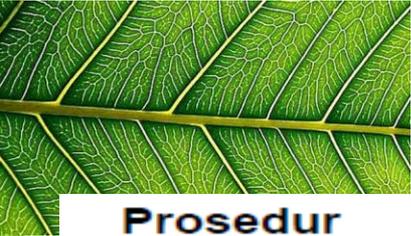
Setiap koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) yang tumbuh pada media diasumsikan berasal dari satu sel, sehingga satuan populasi sel g^{-1} atau sel ml^{-1} . Sedangkan bagi koloni fungi pelarut fosfat (FPF) tidak bisa diasumsikan dari pertumbuhan satu sel karena ada beberapa kemungkinan dari setiap pertumbuhan koloni. Satu koloni fungi bisa tumbuh dari setiap bagian fungi misalnya dari potongan hifa, satu spora atau serangkaian spora, dan miselium (kumpulan hifa) sehingga satuan pertumbuhannya merupakan unit/ satuan pembentuk koloni (spk = satuan pembentuk koloni = cfu = *colony forming unit*). Sehingga untuk fungi mempunyai satuan spk g^{-1} atau spk ml^{-1} .



Enumerasi

Bahan dan alat

- Media agar Pikovskaya (lihat 2.6.1.2)
- Neraca analitik ketelitian dua desimal
- Labu Erlenmeyer 1 L
- Cawan Petri steril.
- Tabung reaksi steril
- Pipet mikro 1 ml
- Alat penghitung koloni
- Contoh tanah



Enumerasi

Prosedur

- Timbang 1 g contoh tanah dalam pinggan aluminium, masukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Dengan menggunakan penjepit, angkat pinggan aluminium, masukkan ke dalam eksikator, diamkan sampai dingin, dan timbang. Bobotnya merupakan bobot contoh tanah kering (Sulaeman *et al.*, 2005)
- Atur pH media selektif agar Pikovskaya (pada saat pembuatan) menjadi pH 7,0 dengan cara titrasi dengan 0,1 N HCl jika media pH > 7 atau 0,1 N NaOH jika media pH < 7 .
- Lakukan penanaman MPF seperti pada 2.6.1 pada pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} .
- Inkubasikan pada suhu kamar selama 4-7 hari.
- Hitung koloni yang tumbuh yang disertai dengan zona bening dengan memperhatikan hal-hal sebagai berikut:
 - Jumlah koloni setiap cawan Petri antara 30 – 300, jika tidak ada maka dipilih yang mendekati 300 koloni.
 - Tidak ada satu koloni yang tumbuh melebihi dari setengah cawan Petri.
 - Perbandingan jumlah koloni antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya (pada pengenceran berturutan), jika sama atau lebih kecil hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar data dari pengenceran sebelumnya yang dipakai.
 - Tentukan populasi MPF.



Enumerasi

Perhitungan:

$$\text{Populasi MPF (spk g}^{-1}\text{ tanah kering)} = \frac{C \times FP}{BK}$$

Keterangan:

C = jumlah koloni

FP = faktor pengenceran

BK = bobot kering tanah

spk = satuan pembentuk koloni



Ulasan

Penggunaan fungisida ternyata seringkali tidak bisa meniadakan pertumbuhan koloni fungi tetapi hanya bisa menghambat atau mengurangi terbentuknya koloni fungi, demikian pula penggunaan bakterisida. Walaupun begitu penggunaan biosida sangat membantu pekerjaan isolasi MPF terutama isolasi BPF.

Pada pengukuran zona bening, ternyata lebar zona bening juga dipengaruhi oleh ketebalan media agar Pikovskaya dalam cawan Petri. Koloni yang tumbuh pada bagian yang lebih tebal biasanya zona bening akan lebih sempit, sebaliknya pada bagian yang tipis lebar zona bening lebih besar. Untuk menghindari hal tersebut, perlu diperhatikan bahwa pada waktu menuangkan media agar Pikovskaya ke dalam cawan Petri harus diusahakan tebal media di dalam cawan Petri merata. Hal ini dapat dilakukan jika pada waktu menyimpan cawan Petri (sesaat setelah dituangi media agar Pikovskaya), cawan Petri diletakkan pada permukaan tempat yang datar, tidak ada kemiringan sedikitpun. Oleh karena itu luas zona bening hanya bisa dipakai untuk indikasi awal, bahwa koloni merupakan koloni MPF yang mampu melarutkan fosfat dari sumber fosfat penyusun media. Dengan kata lain, lebar diameter zona bening tidak bisa dipakai sebagai pedoman untuk mengukur kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat.



Ulasan

Beberapa bakteri dari genus *Pseudomonas* bersifat sebagai penyakit bagi berbagai tanaman seperti kentang yaitu *Pseudomonas solanacearum*. Pengujian sifat patogen bagi MPF perlu dilakukan terutama bagi isolat dari hasil isolasi MPF pada contoh tanah yang tidak ada tanaman atau yang berasal dari rizosfer tanaman yang mempunyai pertumbuhan kurang normal. Oleh karena itu pengambilan contoh tanah untuk isolasi MPF dianjurkan pada tanah rizosfer yang pertumbuhan tanamannya bagus.

Setelah diamati, seringkali ditemukan bahwa tidak semua koloni yang tumbuh pada media Pikovskaya membentuk zona bening. Hal ini karena sebagian fosfat dari sumber fosfat yang digunakan walaupun tanpa MPF, bisa larut dalam media, sehingga walaupun kelarutannya sangat sedikit/terbatas maka mikroba tertentu yang kebetulan ikut tertuang di dalam cawan, mampu memanfaatkan ketersediaan fosfat tersebut dan mampu membentuk koloni. Keadaan ini menyebabkan adanya persoalan pada waktu penghitungan koloni MPF.



TERIMA KASIH