

IDENTIFIKASI SENYAWA PROTEIN SPESIFIK KEBUNTINGAN TIPE B (PSPB) HASIL FILTRASI DENGAN SEPHADEX-GEL 25 SEBAGAI BAHAN SENYAWA DETEKSI KEBUNTINGAN DINI

Totti Tjiptosumirat, Irawan Sugoro, dan B.J. Tuasikal, dan N. Lelaningtyas

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan
Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

IDENTIFIKASI SENYAWA PROTEIN SPESIFIK KEBUNTINGAN TIPE B (PSPB) HASIL FILTRASI DENGAN SEPHADEX-GEL 25 SEBAGAI BAHAN SENYAWA DETEKSI KEBUNTINGAN DINI. Penelitian dan pengembangan peternakan yang dilakukan belakangan ini lebih mengarah pada peningkatan produksi ternak, yaitu melalui perbaikan kinerja reproduksi, perbaikan kesehatan dan tata laksana atau manajemen ternak. Salah satu cara peningkatan efisiensi reproduksi ternak adalah dengan melakukan pengembangan sistem deteksi kebuntingan secara dini, yang ditunjang dengan perbaikan pasokan pakan melalui stimulasi fungsi rumen, dan dengan cara pencegahan penyakit, yang berpengaruh pada produksi, yaitu mastitis. Pengembangan deteksi kebuntingan dini akan diarahkan pada keberadaan protein spesifik yang hanya ada pada saat ternak bunting, yaitu protein spesifik kehamilan tipe B (PSPb). Deteksi kebuntingan secara dini merupakan hal yang penting, terutama dalam menunjang program inseminasi buatan (IB). Kegiatan dalam litbang yang dilakukan saat ini meliputi pendeteksian PSPb hasil filtrasi dengan teknik Sephadex-gel 25 yang hasilnya akan digunakan sebagai bahan pembuatan kit RIA. Bahan PSPb ini berasal dari sampel kotiloden plasenta. Hasil ekstraksi dan filtrasi dalam penelitian menunjukkan bahwa PSPb dapat dideteksi dengan menggunakan elektroforesis yang berasal dari sampel kotiledon plasenta dengan kisaran berat molekul 20 – 40 kbp. Hal ini akan dilanjutkan pada kegiatan penelitian selanjutnya dengan isolasi PSPb dari kotiledon plasenta yang selanjutnya akan diseparasi dengan sistem chromatografi, untuk mendapatkan bahan baku anti-PSPb dalam pembuatan kit radioimmunoassay–PSPb (kit RIA PSPb).

Kata kunci: deteksi kebuntingan dini; PSPb; filtrasi

PENDAHULUAN

Hasil dari kegiatan penelitian dan pengembangan pada tahun anggaran 2000 – 2005, telah berhasil mengembangkan dan mengaplikasikan hormon progesterone untuk mendeteksi kegagalan suatu proses Inseminasi Buatan (IB) secara dini atau sebagai alat untuk mendeteksi kegagalan bunting pada sapi perah. Selanjutnya, dalam aplikasi teknik RIA progesteron ini, ditemukan bahwa keakuratan penggunaan hormon progesteron tersebut untuk pengujian kebuntingan mempunyai kepekaan sekitar 70%, dan membutuhkan sampel secara periodik dalam suatu periode tertentu dan dengan jumlah yang lebih dari satu sampel (1). Hal ini disebabkan karena keberadaan progesteron yang terdeteksi dapat disebabkan oleh berbagai macam sebab, misalnya akibat kematian embrio dan keguguran yang berlanjut menjadi endometritis, atau infeksi penyakit pada saluran reproduksi dan dinding rahim, yang dapat menyebabkan terbentuknya *Corpus luteum persistent (CLP)*. Adanya *CLP* pada ovarium menyebabkan produksi progesteron yang dapat terdeteksi dari susu atau darah, padahal sapi tidak dalam keadaan bunting. Disamping itu terdapat variasi konsentrasi progesteron dari setiap individu yang berbeda-beda (1, 2).

Hasil penelitian tahun 2006 menunjukkan bahwa senyawa ekstrak kotiledon plasenta mengandung senyawa PSPb (3). Selama periode awal kebuntingan akan diproduksi sejumlah signal yang disebabkan oleh disekresikannya hormon-hormon steroid, seperti prostaglandin, dan beberapa protein faktor. Beberapa dari hormon dan protein ini dihasilkan oleh plasenta fetus dan diperlukan untuk kesuksesan kehamilan dan proliferasi normal serta neoplastik sel-sel. Tanda-tanda kebuntingan tersebut dikarakterisasi sebagai protein kebuntingan, yaitu bovine lactogen plasenta (bPL), protein spesifik kebuntingan B (*pregnancy specific protein-b*: PSPb) yang merupakan glikoprotein plasenta, dan *bovine pregnancy-associated glycoprotein* (bPAG). Baru-baru ini, profil dari ekspresi gen pada sapi di awal kebuntingan telah dianalisis dengan menggunakan mikroarray cDNA yang mengandung gen independen 1993. Sebanyak 77 gen penginduksi (*induction genes*) dan 22 gen penekan (*suppression genes*) telah berhasil diidentifikasi. Beberapa yang termasuk gen penginduksi adalah bPL, bPAG, dan PSPb (4, 5). Protein-protein ini dapat digunakan untuk pendeteksian kehamilan pada sapi dan memiliki keakuratan tinggi karena hanya dihasilkan pada saat kehamilan (5, 6).

Dengan mengidentifikasi keberadaan senyawa protein spesifik tersebut dan dengan mengisolasinya, maka diharapkan dapat dikembangkan suatu "alat" untuk deteksi kebuntingan secara dini pada ternak ruminansia yang akan lebih praktis dari alat teknologi deteksi sebelumnya, yaitu RIA progesteron, yang juga mempunyai keakuratan lebih tinggi.

BAHAN DAN METODE

Persiapan sampel

Sampel yang digunakan dalam kegiatan ini adalah ekstraksi kotiledon ternak sapi bunting (hasil penelitian tahun anggaran 2006), berasal dari kotiledon ternak sapi bunting yang digunakan dari ternak bunting yang mengalami keguguran di daerah peternakan tradisional Bayombong Kabupaten Garut dan peternakan sapi dari daerah Mampang Jakarta Selatan.

Separasi PSPb dengan elektroforesis

Sesuai hasil kegiatan yang lalu dari hasil proses separasi dengan elektroforesis, masih banyak ditemui senyawa lain selain PSPb, oleh sebab itu, dalam kegiatan kali ini, sebelum proses separasi dengan elektroforesis, dilakukan proses filtrasi dengan Sephadex 25G.

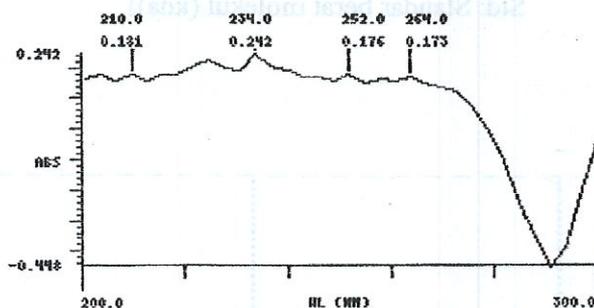
Sebanyak 2,5 g Sephadex 25G dilarutkan dengan lebih kurang 100 ml NaOH 0,1 secara perlahan di dalam kolom. Kemudian ke dalam gel Sephadex 25G tersebut di masukkan lebih kurang 250 ml larutan stok ekstraksi kotiledon yang dilarutkan dalam Ammonium persulfat 30% (AMPS) dan telah melalui proses penyaringan dengan kertas saring Wattman 41. Sebanyak lebih kurang 100 ml filtrat larutan yang mengandung PSPb hasil penyaringan, disimpan dalam suhu – 20°C hingga perlakuan selanjutnya.

Analisis sampel dalam penelitian ini menggunakan metode elektroforesis 1-D SDS-PAGE dengan sistem buffer Laemli. Konsentrasi poliakrilamida yang digunakan adalah 10 %, pH buffer elektroforesis 8,3, pH 'stacking gel' 6,8 dan pH 'separating gel' 8,8, serta volume sampel untuk tiap sumur adalah 10 µl. Protein standar (Biorad) yang digunakan adalah protein berat standar dengan kisaran 14 – 94 kDa. Gel diwarnai dengan Coomassie Brilliant Blue R-250.

Karakterisasi keberadaan kandungan PSPb dilakukan dengan dasar intrapolasi melalui garis linier yang ditentukan melalui gambaran film yang didapat dari hasil pembacaan sampel melalui elektroforesis, dengan aksis sumbu Y adalah berat molekul (kDa) dan sumbu X adalah noda protein pada film.

Separasi PSPb dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Sampel ekstrak PSPb dicari terlebih dahulu panjang gelombang optimumnya menggunakan spektrofotometer UV untuk menentukan jenis detektor pada sistem KCKT, yaitu $\lambda_{200-400}$. Hasil pencarian didapat panjang gelombang optimum ekstrak PSPb yaitu λ_{234} , seperti disajikan berikut ini:



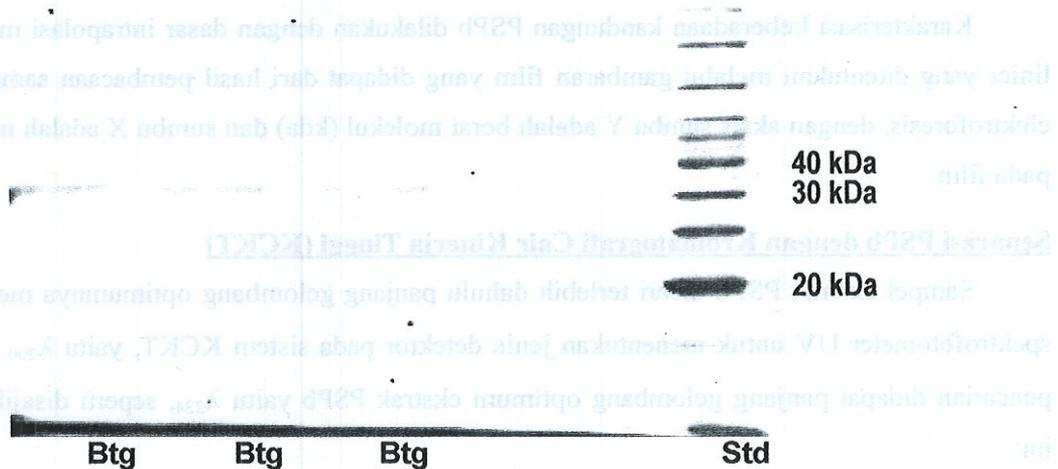
Gambar 1. Hasil penelusuran panjang gelombang ekstrak senyawa PSPb.

Untuk proses separasi ekstrak PSPb dengan KCKT digunakan solvent yang bersifat polar, yaitu campuran metanol dengan air 1:1, dengan kolom ODS/C18, dan jumlah sampel yang diinjeksikan 30 µl dengan waktu retensi 30 menit.

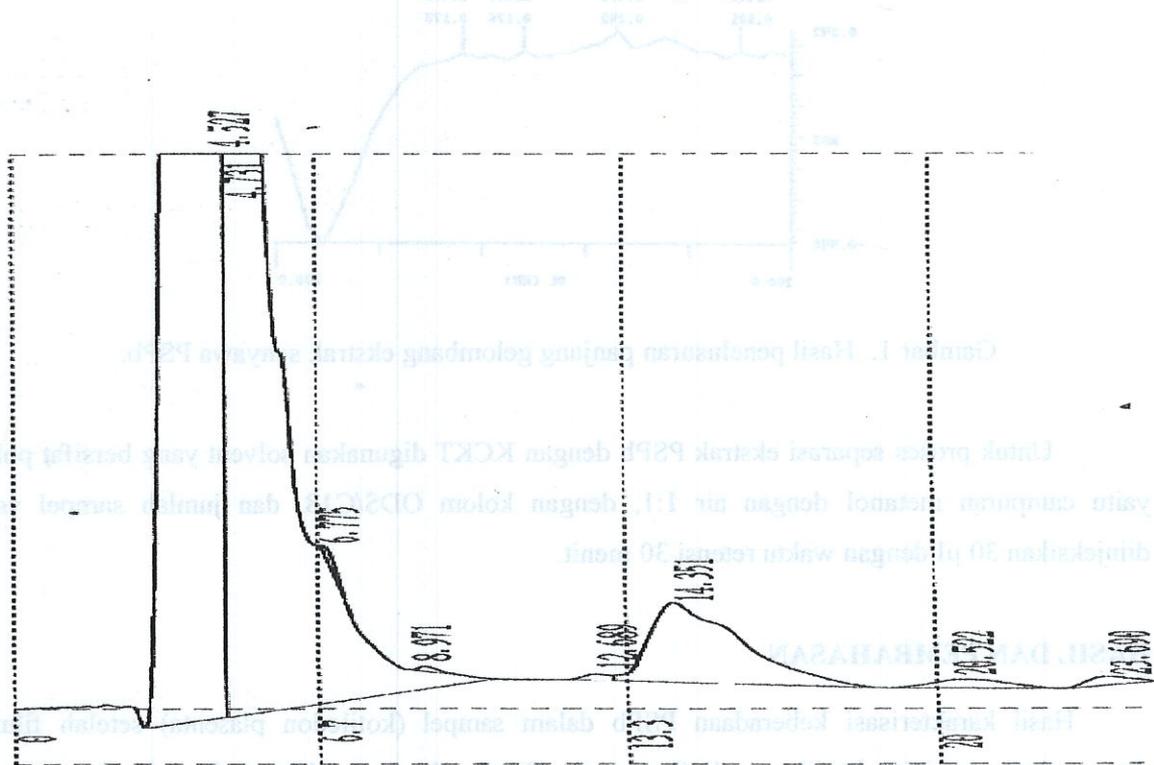
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil karakterisasi keberadaan PSPb dalam sampel (kotiledon plasenta) setelah filtrasi dengan Sephadex-25G disajikan pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan bahwa dugaan senyawa PSPb masih terdapat dalam bahan filtrat hasil penyaringan dengan metode sephadex-25G, yaitu sebagai senyawa dengan kisaran berat molekul antara 30 – 40 kDa. Keadaan ini seperti yang telah diungkapkan dalam hasil penelitian sebelumnya (4, 5). Konfirmasi ulang dari eksistensi senyawa PSPb ini perlu untuk dilakukan kembali dengan menggunakan Standar protein kebuntingan (6).

Hal yang sama juga didapat dari hasil karakterisasi PSPb dengan menggunakan metode KCKT, seperti yang disajikan pada Gambar 3.



Gambar 2. Profil protein urin dan kotiledon (Btg: ekstrak kotiledon sapi bunting, Std: Standar berat molekul (kda)).



Gambar 3. Hasil separasi senyawa ekstrak kotiledon terfiltrasi dengan metode KCKT.

Gambar 3 menunjukkan bahwa proses separasi PSPb yang dilakukan dengan metode KCKT, belum dapat digunakan sebagai hasil akhir dan masih perlu dilakukan penelaahan lebih

lanjut. Hal ini disebabkan karena perbandingan antara pelarut ekstrak PSPb dengan senyawa pelarut belum dilakukan, sehingga Gambar 3 tersebut masih belum menunjukkan adanya karakter dari senyawa PSPb sebagai bahan yang dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan dini. Dengan demikian, analisis KCKT untuk pelarut ekstrak senyawa ekstrak PSPb perlu dilakukan. Selain itu, tersedianya standard dari protein-protein yang ada selama masa kebuntingan juga diperlukan, dan keadaan ini menyebabkan proses separasi cenderung didasari dari hasil separasi elektroforesis.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Protein spesifik kebuntingan tipe B (PSPb) telah berhasil dideteksi dengan menggunakan elektroforesis dan diperkuat dengan metode KCKT, dengan kisaran berat molekul 20 – 40 kDa. Isolasi PSPb dari kotiledon masih perlu penyempurnaan untuk ekstraksi lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

1. JAINUDEEN, M.R., and HAFEZ, E.S.E., Pregnancy Diagnosis. In: Hafez, E.S.E and Hafez, B. Eds. *Reproduction in Farm Animals*, 7th Edition: Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore Maryland. (2000) 293-311.
2. TJIPTOSUMIRAT, T., B.J. TUASIKAL and N. LELANANINGTYAS. Reproductive Disorder Studies Using Radioimmunoassay (RIA) Progesterone on Dairy Cattle. *Scientific Journal for the Application of Isotopes and Radiation*. (2006) 2:1. pp. 30-49.
3. TJIPTOSUMIRAT, T., B.J. TUASIKAL dan I. Sugoro. Identifikasi senyawa protein spesifik kebuntingan tipe B (PSPb) sebagai bahan senyawa deteksi kebuntingan dini (2006), Laporan Teknis Penelitian, PATIR - BATAN.
4. HUANG, F. , COCKRELL, D.C., STEPHENSON, T.R., NOYES, J.H., AND SASSER, R.G. Isolation, Purification, and Characterization of Pregnancy-Specific Protein B from Elk and Moose Placenta In : *Biology of Reproduction Journal*, Vol. 61. p. 1056 – 1061 (1999).
5. PYO, J., IL HWANG, OH, J., JIN LEE, S. CHEOUL KANG, S., SANG KIM, J., AND LIM, J. Characterization of a Bovine Pregnancy-Associated Protein Using Two-Dimensional Gel Elektroforesis, N-Termina Sequencing and mass Spectrofotometry, In : *Proteomics*, Vol 3, p. 2420 – 2427. (2003).
6. CREIGHTON, T.E. *Protein Structure, A Practical Approach*. IRL Press. (1988)
7. WALKER, G.M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Willey and Sons. Chichster. 102 – 110 (1997).

lain. Hal ini disebabkan karena perbandingan antara protein untuk P2P dengan enzim gelatin dalam dilakukan, sehingga Gambar 3 tersebut masih belum menunjukkan adanya kurva dari enzim P2P sebagai bahan yang dapat digunakan untuk deteksi kehamilan dini. Dengan demikian, analisis KCKT untuk protein untuk P2P perlu dilakukan. Selain itu, terdapatnya standar dan protein-protein yang ada selama masa kehamilan juga diperlukan dan kondisi ini menyebabkan proses seperti cenderung dibantu dari hasil separasi elektrofisis.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein spesifik kehamilan tipe B (P2P) telah berhasil dideteksi dengan menggunakan elektrofisis dan diperturb dengan metode KCKT. Dengan ukuran berat molekul 20 - 40 kDa isolasi P2P dari kedondong masih perlu pemurnian untuk analisis lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

1. JAINUDEEN, M.R., and HABIB, E.S.E. Pregnancy Diagnosis. In: Habib, E.S.E. and Habib, H. (Eds). Reproduction in Farm Animals, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Maryland (2000) 293-311.
2. TRIPTOUMIRAT, T., B.J. TUASIKAL and N. LELANANINGTYAS. Reproductive Disorder Studies Using Radioimmunoassay (RIA) Progesterone on Dairy Cattle. Scientific Journal for the Application of Isotopes and Radiation. (2006) 2:1. pp. 38-42
3. TRIPTOUMIRAT, T., B.J. TUASIKAL dan I. Sugoro. Identifikasi senyawa protein spesifik kehamilan tipe B (P2P) sebagai bahan senyawa deteksi kehamilan dini (2006). Laporan Teknis Penelitian PATIR - BATAN.
4. HUANG, F., COCKRELL, D.C., STEPHENSON, T.R., NOYES, J.H. AND PASZBER, R.G. Isolation, Purification, and Characterization of Pregnancy-Specific Protein B from Elk and Moose Falcata in: Biology of Reproduction Journal, Vol. 61, p. 1036 - 1041 (1999).
5. YO, J. IL HWANG, OH, J., JIN LEE, S. CHEOL KANG, S., SANG KIM, J. AND LIM, J. Characterization of a Bovine Pregnancy-Associated Protein Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis, N-Terminal Sequencing and mass Spectrometry. In: Proteomics, Vol. 3, p. 2420 - 2427 (2003).
6. CRIEHTON, T.E. Protein Structure. A Practical Approach. IRL Press (1988).
7. WALKER, G.M. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, Chichester. 102-110 (1997).

PENGUJIAN ISOLAT MIKROBA PELARUT FOSFAT PADA TANAMAN KEDELAI

Taufiq Bachtiar dan Setiyo Hadi Waluyo

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jln. Lebak Bulus Raya Pasar Jumat, Kotak Pos 7002, JKSKL, Jakarta, 12070

Tilpon. 021-7690709 ext 226. Fax. 021-7513270

E-mail : shwaluyo@yahoo.com

ABSTRAK

PENGUJIAN ISOLAT MIKROBA PELARUT FOSFAT PADA TANAMAN KEDELAI.

Percobaan Rhizotron telah dilakukan untuk menguji isolat-isolat mikroba pelarut fosfat (MPF) pada tanaman kedelai di Patir Pasar Jumat. Isolat-isolat MPF yang digunakan diperoleh dengan mengisolasi dari contoh tanah pada perakaran tanaman jagung dari 2 lokasi di daerah Cipanas dan 1 lokasi di Cicurug Jawa Barat. Berdasarkan kemampuannya membentuk zona bening maka telah diperoleh 6 isolat (Isolat 1, 2, 4, 5, 7, 8) dari lokasi Cipanas I, 2 Isolasi (Isolat 4 dan 11) dari lokasi Cipanas II, dan 2 Isolasi (Isolat A dan C) dari Cicurug. Isolasi 7 dan isolasi 8 mempunyai ukuran koloni yang besar, membentuk zona bening yang lebar dan mempunyai daya larut $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang paling tinggi. Pertumbuhan tanaman kedelai dan berat basah akar meningkat dengan pemakaian isolat-isolat MPF tersebut. Dibandingkan dengan kontrol, tinggi tanaman meningkat sampai 427 %, berat basah tanaman meningkat sampai 857 %, berat basah akar meningkat sampai 650 %, dan jumlah daun meningkat sampai 266%. Hasil yang diperoleh karena inokulasi MPF tidak berbeda nyata dengan hasil yang diperoleh karena penambahan CaCO_3 dan SP-36. Eksploitasi dan seleksi MPF asli Indonesia masih terbuka lebar untuk dikembangkan sebagai elite MPF sebagai bahan dasar untuk pengembangan produksi pupuk hayati.

Kata Kunci : Mikroba Pelarut Fosfat, Kedelai, Fosfat, Pupuk hayati, Rhizotron.

ABSTRACT

EFFECT OF APPLICATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING MICRO-ORGANISM ON GROWTH OF SOYBEAN PLANT.

Rhizotron experiments were conducted to study the effect of application of phosphate solubilizing microorganism (PSM) on growth of soybean plant in PATIR-BATAN Pasar Jumat, Jakarta. PSM isolates were obtained from soil samples collected from corn-rhizospheres from 2 locations in Cipanas and 1 location in Cicurug, West Java. Based on visual observations on the development of halo-zone on Pikovskaya agar media, 6 isolates (1, 2, 4, 5, 7, 8) from Cipanas I, 2 isolates (isolate 4 and 11) from Cipanas 2 and 2 isolates (isolate A dan C) from Cicurug were collected. Isolate 7 and isolate 8 formed big colonies, wide halo-zones and have highest abilities on solubilization of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Application of PSM increased growth of soybean plants. Compared to control, plant-height, plant-weight, root-weight and number of leaves increased by 427, 857, 650 and 266 % respectively. There were statistically no difference results obtained from PSM, CaCO_3 and SP-36 applications. Chance to select and to exploit an elite indigenous PSM in Indonesia is still quite open and promising for production of bio-fertilizer.

Keywords: PSM, Soybean, Phosphate, Bio-fertilizer, Rhizotron.

PENDAHULUAN

Salah satu unsur hara dalam tanah yang diperlukan oleh tanaman adalah unsur fosfor (P). Unsur P sangat penting dalam metabolisme tanaman seperti pembelahan sel, pembentukan albumin, pembentukan bunga, buah, dan biji, mempercepat pematangan, memperkuat batang sehingga tidak mudah roboh, perkembangan akar, membentuk *nucleoprotein* (sebagai penyusun DNA dan RNA), menyimpan dan memindahkan energi misalkan ATP dan ADP (Hardjowigeno, 2003). Oleh karena itu penambahan P ke dalam tanah mutlak diperlukan untuk menunjang

pertumbuhan tanaman. Pemberian pupuk P ke dalam tanah seringkali tidak efektif, hal ini disebabkan karena unsur P dalam tanah ketersediaannya sangat dipengaruhi oleh sifat kimia tanah. Pada tanah masam kelarutan Al dan Fe menjadi tinggi, dengan demikian ion fosfat (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) akan segera terikat membentuk senyawa P yang kurang tersedia bagi tanaman. Mula-mula senyawa ini bersifat koloidal, lambat laun menjadi kristal yang sukar larut *varisit* $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan *strengit* $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Havlin *et al*, 1999).

Untuk meningkatkan efisiensi pemupukan P dan meningkatkan ketersediaan P saat ini telah dikembangkan pemanfaatan mikroba tanah. Mikroba tanah mempunyai peranan yang sangat penting dalam proses penguraian bahan organik kompleks yang secara enzimatik akan membebaskan nutrien dari fraksi mineral tanah sehingga tersedia bagi tanaman (Athlas dan Bartha, 1993). Salah satu kelompok mikroba tanah yang penting adalah Mikroba Pelarut Fosfat (MPF). MPF merupakan satu-satunya kelompok mikroba yang dapat melarutkan P yang terjerap permukaan oksida-oksida Fe-P dan Al-P (Hartono, 2000). Mekanisme utama dalam konversi ini sebagai akibat dari asam-asam organik yang dihasilkan oleh MPF. Asam organik utama yang dapat melarutkan fosfat adalah sitrat, laktat, glutamat, oksalat, asetat, tartarat, malat, fumarat, suksinat dll (Goenadi dkk, 2000). Asam organik ini menghasilkan ion H^+ yang dapat melarutkan fosfat dan menjadikannya tersedia bagi tanaman (Bhattacharyya *et al*, 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan MPF yang efektif dalam menyediakan P bagi tanaman untuk dikembangkan menjadi pupuk hayati.

BAHAN DAN METODE

Bahan, Tempat dan Waktu

Percobaan ini telah dilaksanakan pada bulan April 2009 sampai September 2009 di *greenhouse* dibidang pertanian PATIR-BATAN, Jl. Lebakbulus Raya, Cilandak, Jakarta Selatan. MPF diisolasi dari contoh tanah yang berasal dari rhizosfer jagung didaerah Cipanas dan Cicurug. Contoh tanah dimasukan kedalam kantong plastik berwarna hitam kemudian dibawa ke laboratorium mikrobiologi tanah PATIR-BATAN. Tanah dikeringanginkan, mikroba diisolasi dan dihitung populasinya dengan teknik penghitungan cawan petri (Thompson, 1989; Revina *et al*, 1992), kemudian dimurnikan dan diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat dengan spektrofotometer.

Isolasi dan penghitungan jumlah populasi MPF

Contoh tanah kering angin sebanyak 10 g dimasukan ke dalam 90 ml aquadest steril dalam Erlenmeyer 250 ml dikocok dengan tangan sampai homogen. Sebanyak 1 ml dari ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquadest steril, kemudian dikocok hingga homogen dan 1 ml dipindahkan ke tabung berikutnya, begitu seterusnya sehingga terjadi seri pengenceran

10^{-1} sampai 10^{-7} . Media Agar Pikovskaya (5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10 g glukosa, 0.2 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NH_4SO_4 , 0.1 ml MnSO_4 dan FeSO_4 , Agar 15 g dilarutkan dalam 1 liter H_2O) dituangkan ke dalam petridish steril kemudian setelah media dingin dan membeku sebanyak 0.1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam media tersebut kemudian diratakan dengan batang gelas L. Media diinkubasi selama 3, 10, dan 15 hari pada suhu 28°C . Koloni yang memiliki zona bening dihitung dan diamati secara visual (Tabel 1). Koloni-koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan cara ditumbuhkan kembali (re-streak) dengan jarum Ose pada media Pikovskaya. Koloni tunggal (single colony) ditumbuhkan pada media agar miring dan disimpan.

Uji kemampuan MPF melarutkan P dalam media larutan pikovskaya secara spektrofotometri

Inokulan satu loop Ose dari kultur agar miring diinokulasikan kedalam 50 ml media larutan Pikovskaya (5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10 g glukosa, 0.2 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NH_4SO_4 , 0.1 ml MnSO_4 dan FeSO_4 dilarutkan dalam 1 liter H_2O) steril, digojok dengan mekanikal shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 15 hari. Larutan kultur 10 ml diambil secara aseptik pada umur 3 hari, 5 hari dan 15 hari, dan kemudian jumlah P tersedia dalam masing-masing larutan kultur tersebut diukur dengan spektrofotometer.

Pembuatan inokulan

Jumlah MPF yang dipakai dalam penelitian ini adalah 10 yaitu Isolat 1, Isolat 2, Isolat 4, Isolat 5, Isolat 7, Isolat 8, Isolat4 (2), Isolat 11, Isolat A, Isolat B dan *Pseudomonas F*. Satu loop Ose dari masing-masing isolat tersebut diatas diinokulasikan pada 50 ml larutan media Pikovskaya, dikocok pada suhu kamar dengan kecepatan 100 rpm selama 3 hari. Jumlah sel dari masing-masing biakan isolat tersebut ialah $10^6 - 10^8$ CFU/ml.

Persiapan Media Tanam

Percobaan dalam penelitian ini menggunakan Rhizotron, hal ini dimaksudkan untuk memudahkan pengamatan pertumbuhan akar, selain itu pada saat panen akar yang diambil untuk sampel utuh, tidak rusak atau terganggu. Rhizotron dibuat dari petri plastik (diameter 10 cm) dengan cara memotong bagian pinggir selebar 1 cm dengan menggunakan gerinda (Gambar1). Contoh tanah yang dipakai berasal dari Palembang dan Jakarta. Contoh tanah kering angin dengan ukuran lolos saringan 2 mm ditambah air sampai sekitar kapasitas lapang. Sebanyak 75 g contoh tanah basah tersebut dimasukkan kedalam Rhizotron, kemudian tanah dipadatkan dengan cara menekan bagian permukaan rhizotron dengan menggunakan plastik akrilik sehingga semua bagian rhizotron terisi rata oleh tanah dan kepadatannya sama. Rhizotron ditutup dengan penutupnya dan siap dipakai untuk percobaan. Untuk percobaan Rhizotron digunakan kedelai varietas Rajabasa. Benih kedelai direndam dalam air selama 1 jam, kemudian 2 butir dari benih tersebut ditanam kedalam Rhizotron. Satu kecambah yang bagus dipilih untuk perlakuan selanjutnya. Setelah semua rhizotron ditanami selanjutnya diinkubasi di rumah kaca sampai tumbuh kecambah dengan posisi

berdiri dengan kemiringan 60 derajat. Hal ini ditujukan agar akar tanaman tumbuh diatas permukaan tanah, sehingga dapat dilakukan pengamatan pola perakaran dengan mudah.

Perlakuan

Percobaan ini terdiri dari 20 perlakuan (Tabel 1) dan 3 ulangan. Perlakuan diberikan langsung pada tanah 0,5 cm dibawah ujung akar tanaman. Sebanyak 1 ml inokulan/benih dari masing-masing isolat diberikan menggunakan disposable syringe. Sedangkan untuk perlakuan CaCO_3 dan SP-36 diberikan dalam bentuk larutan dalam air yaitu 0,5 ml/ benih (0,075 g CaCO_3) dan 0,5 ml / benih (0,0125g SP-36).

Pemeliharaan dan Pengamatan

Pemeliharaan dilakukan setiap hari dengan memberikan air sebanyak kapasitas lapang, sedangkan pengamatan dilakukan pada 14 HST dan pada saat panen yaitu pada 24 HST. Pengamatan tanaman kedelai meliputi tinggi tanaman, jumlah daun, bobot basah tanaman, dan bobot basah akar. Semua data dihitung secara statistik dengan program komputer MSTAT-C. Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada beda nyata pada $\alpha = 5 \%$ dengan Multiple Duncan's Test.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pertumbuhan koloni pada media Pikovskaya dan pembentukan zona bening, ditemukan ada 6 populasi mikroba pelarut fosfat (MPF) pada contoh tanah dari lokasi Cipanas I, yaitu isolat 1, isolat 2, isolat 4, isolat 5, isolat 7 dan isolat 8, 2 populasi MPF pada contoh tanah Cipanas II, yaitu isolat 4 dan isolat 11 dan 2 populasi MPF pada contoh tanah Cicurug, yaitu isolat A dan isolat C (Tabel 3). Jumlah sel (cfu) dari beberapa isolat tersebut bervariasi dari $10^2 - 10^8/\text{g}$ tanah. Yang paling dominan adalah isolat 1, isolat 7 dan isolat 8 dengan tingkat populasi $10^8/\text{g}$ tanah (Tabel 2). Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa akar tanaman jagung dapat meningkatkan jumlah-sel dari populasi mikroba disekitarnya. Umumnya pada tanah-tanah pertanian jumlah sel mikroba berada disekitar 10^4 sel/g tanah. Oleh karena itu untuk memperoleh manfaat yang optimal dari MPF, selalu dianjurkan untuk meningkatkan jumlah sel mikroba dalam tanah dengan pemberian dari luar dalam bentuk inokulan. Daya larut terhadap P tidak tersedia [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] menjadi tersedia (dalam media Pikovskaya) juga bervariasi. Daya larut yang paling tinggi diperoleh dari MPF isolat 7 dan isolat 8. Ukuran koloni MPF yang tumbuh pada media Pikovskaya juga bervariasi dari ukuran sebesar titik (kecil) , sekitar 2,0 mm (medium) dan 3,0-5,0 mm (besar) (Tabel 3). Dari pengamatan secara visual tersebut menunjukkan bahwa ukuran koloni MPF sangat berhubungan dengan daya larut terhadap $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Isolat 7 dan isolat 8 membentuk koloni yang besar dan mempunyai daya larut $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang paling tinggi. Hal ini dipertegas lagi dengan terbentuknya zona bening yang sangat besar dari isolat 7 dan isolat 8 (Gambar 2). Zona bening adalah salah satu parameter kualitatif yang sangat

penting dalam identifikasi dan isolasi MPF. Dari hasil data pada tabel 2 dan 3 juga menunjukkan bahwa kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat tidak tersedia menjadi tersedia berhubungan dengan kecepatan tumbuh dari mikroba tersebut. Waktu tumbuh yang diperlukan oleh isolat 7 dan isolat 8 yang mempunyai kemampuan melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang tinggi adalah 3 hari. Sedangkan isolat lainnya memerlukan waktu tumbuh 5 hari.

Hasil dari percobaan Rhizotron menunjukkan bahwa pemberian MPF dapat meningkatkan tinggi tanaman, berat basah akar, berat basah tanaman dan jumlah daun. Pada tanaman umur 14 HST dibandingkan dengan kontrol tinggi tanaman meningkat 427 %, sedangkan pada tanaman umur 21 HST tinggi tanaman meningkat sampai 415 % (Tabel 4). Berat basah akar dan berat basah tanaman meningkat masing-masing menjadi 650 % dan 857 % (Tabel 5). Demikian juga untuk jumlah daun, terjadi peningkatan sebesar 267 pada umur 14 HST dan 205 % pada umur 21 HST karena pemberian MPF (Tabel 6). Hasil dari percobaan ini juga menunjukkan bahwa tidak ada beda nyata antara pemberian isolat MPF dengan pemberian SP-36. Hal ini berarti bahwa isolat-isolat MPF tersebut mampu menyediakan unsur hara P ekuivalen dengan unsur P yang diberikan melalui SP-36.

KESIMPULAN

Dari hasil-hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa rhizosfer tanaman jagung adalah media yang cocok untuk mengisolasi MPF. Pemberian MPF mampu menggantikan fungsi dari pupuk P terhadap pertumbuhan tanaman kedelai. Melihat kemampuannya yang bervariasi, menunjukkan bahwa masih terbuka lebar untuk melakukan eksploitasi dan seleksi MPF asli Indonesia untuk dikembangkan sebagai elite MPF sebagai bahan dasar untuk pengembangan produksi pupuk hayati.

DAFTAR PUSTAKA

1. Athlas, R.M. and R. Bartha. *Microbial ecology, Fundamentals and Applications*. New York: Addition Wesley. (1993).
2. Bhattacharyya, R., Jain R.K., *Fert. News*, 45, 45-52. (2000).
3. Goenadi, D.H., Siswanto, Sugiarto, Y. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64, 927-932. (2000).
4. Hardjowigeno, Sarwono. *Ilmu Tanah*. Edisi Baru. Akademi Pressindo. Jakarta. (2003).
5. Hartono, A. Pengaruh Pupuk Fosfor, Bahan Organik dan Kapur Terhadap Pertumbuhan Jerapan P Pada Tanah Masam Latosol Darmaga. *Gakuryoku* 6 (1): 73-78.(2000).
6. Havlin, J.L. J.D. Beaton., S.L. Tisdale., and W.L. Nelson. *Soil Fertility and Fertilizer. An Introduction to Nutrient Management*. Sixth ed. Prentice Hall, New Jersey. (1999).
7. Revina, M.D. M.J. Acea, and T. Carballas. Seasonal Fluctuations in microbial populations and available nutrients in forest soil. *Biology Fertilizer Soils* 16: 198-204. (1992).
8. Thompson, J.P. Counting Viable Azotobacter Chroococcum in vertisols. *Plant and Soil* 117: 1-9. (1989).

Tabel 1. Jumlah perlakuan percobaan MPF pada tanaman kedelai.

MPF	Contoh tanah	
	Palembang	Jakarta
ISOLAT 7	1	11
ISOLAT 8	2	12
ISOLAT 4	3	13
ISOLAT 11	4	14
ISOLAT A	5	15
ISOLAT C	6	16
AIR	7	17
TSP	8	18
CaCO ₃	9	19
CaCO ₃ +SP-36	10	20

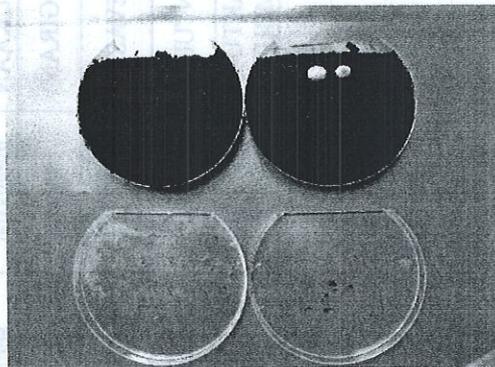
Tabel 2. Populasi MPF tanah Cipanas I dan daya larut terhadap Ca₃(PO₄)₂ dalam larutan media Pikovskaya

MPF	Σ MPF (sel/g tanah)	P- Total (ppm)	
		3 HSI	5 HSI
Isolat 1	1,8 x 10 ⁸	3 HSI	6,67
		5 HSI	8,50
		15 HSI	10,67
Isolat 2	2,9 x 10 ⁷	3 HSI	7,94
		5 HSI	8,44
		15 HSI	9,78
Isolat 4	8,2 x 10 ⁵	3 HSI	3,67
		5 HSI	8,67
		15 HSI	9,28
Isolat 5	4,4 x 10 ⁴	3 HSI	5,44
		5 HSI	7,61
		15 HSI	8,72
Isolat 7	1,0 x 10 ⁸	3 HSI	8,61
		5 HSI	15,89
		15 HSI	16,00
Isolat 8	1,2 x 10 ⁸	3 HSI	8,50
		5 HSI	16,00
		15 HSI	15,56
P. Fluorescen		3 HSI	8,22
		5 HSI	8,78
		15 HSI	13,89

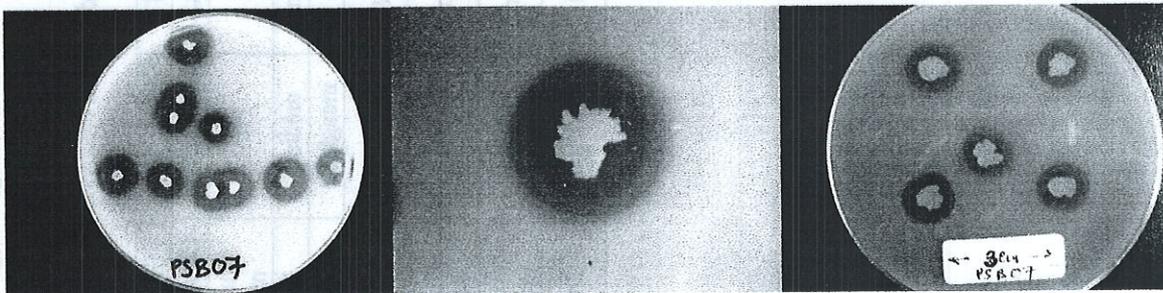
*HSI = Hari Setelah Inkubasi

Tabel 3. Karakteristik koloni mikroba pelarut fosfat pada media Pikovskaya

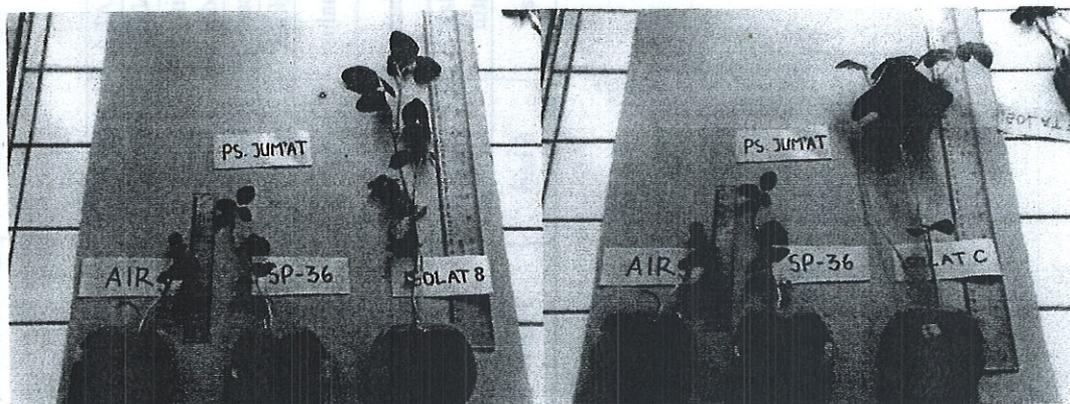
MPE	ISOLAT 1	ISOLAT 2	ISOLAT 4	ISOLAT 5	ISOLAT 7	ISOLAT 8	ISOLAT 4	ISOLAT 11	ISOLAT A	ISOLAT C
ASAL	CIPANAS I	CIPANAS I	CIPANAS I	CIPANAS I	CIPANAS I	CIPANAS I	CIPANAS II	CIPANAS II	CICURUG	CICURUG
WARNA KOLONI	Kuning	Kuning	Putih	Putih	kuning muda	kuning muda	coklat	kuning muda	Coklat muda	putih pucat
UKURAN	titik	titik	medium	medium	besar	besar	medium	medium	medium	titik
PERMUKAAN	mengkilat	semu	semu	mengkilat	mengkilat	mengkilat	semu	mengkilat	pucat/semu	pucat/semu
PINGGIRAN	halus	halus	bergerigi	halus	tepi bergerigi	tepi halus	bergerigi	halus	bergerigi	halus
ELEVASI	cembung tidak rata	cembung	cembung	cembung	cembung halus	cembung	cembung halus	cembung	cembung tidak rata	datar/flat
BENTUK	teratur	teratur	teratur	teratur	Tidak teratur	Tidak teratur	teratur	teratur	teratur	teratur
WAKTU TUMBUH	5 hari	5 hari	5 hari	5 hari	3 hari	3 hari	5 hari	3 hari	3 hari	3 hari



Gambar 1. Rhizotron.



Gambar 2. Pembentukan zona bening isolat 7 pada media Pikovskaya dan media Czapek.



Gambar 3. Percobaan Rhizotron pada Tanaman Kedelai

Tabel 4. Pengaruh pemberian MPF pada tinggi tanaman (cm).

MPF	14 HST		24 HST	
	Tanah Palembang	Tanah Jakarta	Tanah Palembang	Tanah Jakarta
ISOLAT 7	28.50 A	15.00 CDEFGH	39.83 ABCD	24.83 ABCDEFGHI
ISOLAT 8	27.83 A	12.17 EFGH	36.17 ABCDEF	22.00 BCDEFGHI
ISOLAT 4	24.33 ABCD	12.60 EFGH	34.33 ABCDEFG	21.33 CDEFGHI
ISOLAT 11	24.33 ABCD	12.00 EFGH	33.67 ABCDEFG	21.67 BCDEFGHI
ISOLAT A	26.83 AB	23.00 ABCDE	40.33 ABC	40.50 ABC
ISOLAT C	25.67 ABC	19.73 ABCDEF	41.50 AB	37.00 ABCDE
AIR	6.667 H	7.000 H	10.00 HI	8.333 I
TSP	25.50 ABC	6.667 H	34.83 ABCDEF	9.333 HI
CaCO ₃	28.07 A	11.83 EFGH	43.00 A	16.17 FGHI
CaCO ₃ +SP-36	28.17 A	10.77 FGH	30.50 ABCDEFG	16.50 FGHI

Tabel 5. Pengaruh pemberian MPF pada berat basah akar dan tanaman (gram)

MPF	Akar		Tanaman	
	Tanah Palembang	Tanah Jakarta	Tanah Palembang	Tanah Jakarta
ISOLAT 7	0.4033 BCDEF	0.4233 BCDEF	1.500 ABCD	0.9400 BCDEFGH
ISOLAT 8	0.3667 BCDEF	0.3633 BCDEF	1.033 BCDEFGH	1.300 ABCDEF
ISOLAT 4	0.5333 BCD	0.3000 BCDEF	1.133 ABCDEFG	0.8900 BCDEFGH
ISOLAT 11	0.4000 BCDEF	0.2167 DEF	1.000 BCDEFGH	0.8000 CDEFGH
ISOLAT A	0.3000 BCDEF	0.8667 A	1.287 ABCDEF	1.933 A
ISOLAT C	0.6000 AB	0.5667 BC	1.713 AB	1.610 ABC
AIR	0.1533 F	0.1333 F	0.2000 H	0.2667 H
TSP	0.4867 BCDE	0.1000 F	0.7667 DEFGH	0.3333 GH
CaCO ₃	0.3667 BCDEF	0.1567 EF	1.433 ABCDE	0.3333 GH
CaCO ₃ +SP-36	0.3833 BCDEF	0.1100 F	1.033 BCDEFGH	0.4033 GH

Tabel 6. Pengaruh pemberian MPF pada jumlah daun.

MPF	14 HST		24 HST	
	Tanah Palembang	Tanah Jakarta	Tanah Palembang	Tanah Jakarta
ISOLAT 7	7.333 AB	5.667 ABCDE	12.00 BCDE	11.00 DE
ISOLAT 8	8.000 A	6.333 ABCD	13.33 ABCD	14.00 ABC
ISOLAT 4	7.333 AB	8.000 A	11.00 DE	15.33 A
ISOLAT 11	5.667 ABCDE	6.000 ABCD	11.00 DE	12.00 BCDE
ISOLAT A	7.667 AB	8.000 A	12.00 BCDE	15.33 A
ISOLAT C	8.000 A	8.000 A	14.33 AB	12.33 BCDE
AIR	3.000 DE	2.000 E	7.000 GH	8.000 FG
TSP	7.000 ABC	3.333 DE	3.333 J	10.67 DE
CaCO ₃	7.000 ABC	3.667 CDE	11.00 DE	8.000 FG
CaCO ₃ +SP-36	7.667 AB	4.667 ABCDE	11.00 DE	10.00 EF

