

## Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Pelarut Fosfat dari Rhizosfer Tanaman Kakao (*Theobroma cacao*)

Setya Puji Handayani Sutaryo, Achmad Himawan<sup>\*)</sup>, Elizabeth Nanik Kristalisasi

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian INSTIPER Yogyakarta

Jl Nangka II, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta

<sup>\*)</sup>Email korespondensi: [wawanhimawan2014@gmail.com](mailto:wawanhimawan2014@gmail.com)

### ABSTRACT

*Phosphate solubilizing bacteria are important to cacao plants for phosphor ion release, so that it is not attached by Fe or Al ion, and it use by plants. These research purposes are to isolation of bacteria that is predicted to have potential as phosphate solubilizing bacteria and it's identification. Research was conducted at Laboratorium Pusat INSTIPER Yogyakarta in March – May 2023. Research used descriptive method, survey at different cacao orchard, sterilization of research tools and materials, sampling of rhizosphere soil of cacao plants, isolation and bacteria identification. Macroscopy observation results were obtained 4 isolates that were showed transparent zones in Pikovskaya's media and it's potential as phosphate solubilizing bacteria. Microscopy observation results were obtained phosphate solubilizing bacteria from every location of sampling that are location 1 at Nglanggeran Kulon hamlet (isolate K1P3U5), location 2 at Gunung Buthak hamlet (isolate K2P2U1) and location 3 at Nglanggeran Wetan hamlet (isolate K3P4U5 and K3P2U2), Nglanggeran Village, Patuk Subdistrict, Gunung Kidul Regency. Phosphate solubilizing bacteria that were obtained are Genus Acetobacter from K1P3U5 and K3P4U5 isolates, and Escherichia from K2P2U1 isolate. From K3P2U2 isolate was not identification yet.*

**Keywords:** Isolation of Bacteria; Rhizosphere; Phosphate Solubilizing Bacteria; Cocoa

### PENDAHULUAN

Kakao adalah salah satu tanaman perkebunan yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Tanaman ini banyak dibudidayakan di berbagai daerah di Indonesia. Walaupun sedikit luas lahannya, kakao juga ditanam di Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, contohnya di Desa Nglanggeran, Kecamatan Patuk, Kabupaten Gunung Kidul. Sekarang Desa ini dikenal sebagai salah satu destinasi wisata yang diunggulkan di DIY dan menjadi Desa Wisata Terbaik Dunia versi UNWTO 2021 (Kementerian Pariwisata dan Ekonomi Kreatif / Badan Pariwisata dan Ekonomi Kreatif, 2024).

Nama ilmiah Kakao adalah *Theobroma cacao*. Tanaman ini termasuk ke dalam famili *Sterculiaceae*. Tanaman kakao berasal dari Amerika Selatan. Sekarang tanaman ini sering ditanam di berbagai lokasi di sekitar katulistiwa (Bulandari, 2016). Berdasarkan data *International Cocoa Organization (ICCO)* pada 2021/2022, Indonesia berada pada peringkat ke-7 sebagai negara produsen kakao terbesar di dunia. Selain peluang ekspor yang semakin terbuka, pasar biji kakao di dalam negeri masih cukup besar (Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura dan Perkebunan, 2023).

Agar tanaman kakao dapat tumbuh dengan baik maka perlu ketersediaan unsur hara yang cukup di dalam tanah, salah satunya yaitu unsur fosfor (P). Kekurangan fosfor akan menghambat biosintesis asam nukleat, fosfolipid dan nukleotida trifosfat sehingga mempengaruhi pembelahan sel, konversi energi dan respirasi seluler yang pada akhirnya akan mengurangi laju fotosintesis pada tanaman kakao. Kadang kala ketersediaan unsur fosfor tidak cukup karena sebagian terikat oleh aluminium (Al) dan besi (Fe) (Cheng et al., 2023).

Peningkatan unsur fosfor dalam tanah dapat dibantu dengan adanya bakteri pelarut fosfat. Bakteri pelarut fosfat dapat membentuk khelat (kompleks stabil) dengan ion positif Al, Fe atau Ca yang mengikat P, akibatnya ion  $H_2PO_4^-$  menjadi bebas dan tersedia bagi tanaman. Publikasi tentang bakteri pelarut fosfat relatif sudah banyak, misalnya pada rhizosfer tanaman karet (Rinata et al., 2024), rhizosfer tanaman jati dan sengon (Mardiansah & Trimulyono, 2021) serta rhizosfer tumbuhan mangrove (Oktaviani et al., 2020). Khusus untuk eksplorasi bakteri pelarut fosfat pada rhizosfer tanaman kakao masih relatif sedikit yang dilaporkan. Bahkan belum pernah ada laporan tentang keberadaan bakteri pelarut fosfat di rhizosfer tanaman kakao di Desa Nglanggeran, Kecamatan Patuk, Kabupaten Gunung Kidul.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat kampus INSTIPER Yogyakarta, Maguwoharjo, Kab. Sleman, Yogyakarta. Lokasi pengambilan sampel tanah dilakukan di tiga lokasi yang berbeda di Kabupaten Gunung Kidul. Lokasi kesatu berada di Dusun Nglanggeran Kulon, Lokasi kedua berada di Dusun Gunung Buthak, Lokasi ketiga berada di Dusun Nglanggeran Wetan, Desa Nglanggeran, Kec. Patuk, Kab. Gunung Kidul. Pada masing-masing lokasi dipilih 5 tanaman yang berbeda dan dari titik yang berbeda menggunakan metode sampling diagonal. Sampel yang digunakan adalah bagian tanah tanaman kakao. Tanah dari masing-masing tanaman dibungkus aluminium foil dan dimasukkan ke dalam *chiller box*, selanjutnya dibawa ke laboratorium. Penelitian dilakukan dari bulan Maret sampai Mei 2023.

Alat yang digunakan yaitu plastik klip, kompor elektrik, timbangan elektrik, aluminium foil, kertas payung, penggaris, termohigrometer, pH meter, Lux meter, kamera (HP), *autoclaf*,

gelas ukur, *Laminar Air Flow (LAF) Cabinet*, lampu bunsen, pinset, pipet, *beaker glass*, gelas *erlenmeyer*, pengaduk, mikroskop, jarum ose, *petridish*, mikro pipet, pipet tetes, gelas preparat, *cover glass*, kertas label, dan lemari pendingin.

Bahan yang digunakan yaitu tanah rhizosfer tanaman kakao yang diperoleh dari kebun kakao di 3 lokasi yang berbeda, media *Pikovskaya* dan media *Nutrient Agar*, aquades, alkohol 70% , kristal violet, Iodine lugol, etanol 95%, dan safranin.

Penelitian menggunakan metode deskriptif dan kuantitatif. Dilakukan survei tanaman kakao di kebun, pengambilan tanah rizosfer, isolasi dan identifikasi bakteri di laboratorium.

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan membungkus alat-alat menggunakan aluminium foil dan kertas payung coklat, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan waktu selama 15 menit. Media yang digunakan berupa Media *Pikovskaya* dan media *Nutrient Agar* yang ditempatkan pada *petridish*. Media dibuat dengan mencampurkan sebanyak 28,0 g serbuk *Nutrient Agar* instan dengan 1000 ml aquades steril, kemudian dimasak di atas kompor listrik sampai mendidih sambil dilakukan pengadukan secara perlahan. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan waktu selama 15 menit. Cara kerja yang sama dilakukan untuk media *Pikovskaya*, tetapi dengan menggunakan 31,1 g serbuk *Pikovskaya* instan.

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara menimbang 5 g tanah rhizosfer tanaman kakao. Tanah dimasukkan ke dalam gelas beker dan dicampur dengan aquades sebanyak 1 liter lalu diaduk hingga homogen. Suspensi bakteri dimasukkan ke dalam *petridish* yang sudah berisi media *Nutrient Agar* dengan metode *pour plate*. Kegiatan ini dilakukan di dalam *Laminar Air Flow (LAF) Cabinet*. Setelah itu *petridish* yang sudah ada bakteri diinkubasi pada suhu 28°C selama 3 hari.

Bakteri yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* lalu ditumbuhkan pada media *Pikovskaya*. Tahap ini dilaksanakan di dalam *Laminar Air Flow (LAF) Cabinet*. Setelah itu *petridish* diinkubasi pada suhu 28°C selama 9 hari. Diamati apakah ada zona bening di sekitar koloni bakteri. Untuk identifikasi bakteri, maka dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui bentuk bakteri dan termasuk Gram positif atau negatif.

Analisis data menggunakan analisis deskriptif dan kuantitatif. Pengamatan makroskopis meliputi warna permukaan atas dan warna permukaan bawah koloni, bentuk koloni. Pengamatan mikroskopis meliputi hasil uji pewarnaan Gram. Analisis kuantitatif yaitu menghitung diameter zona bening pada media *Pikovskaya*. Adapun keterangan kode label isolat sebagai berikut:

K1P1U1

Keterangan : K = Lokasi sampel

P = Pohon

U = Ulangan

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Data pengamatan kondisi lingkungan kebun kakao di Desa Nglanggeran disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Kondisi Kebun Kakao Pada 3 Lokasi Penelitian

Lokasi	Ketinggian lokasi (mdpl)	Suhu udara (°C)	Kelembaban udara (%)	Intensitas penyinaran matahari (lux)	pH tanah
I	393	31,9	76,7	453	6,2
II	370	29,5	77,9	382	5,9
III	359	32,4	75,8	361	6,1

Tabel 1 menunjukkan data kondisi lingkungan di Desa Nglanggeran pada tiga tempat berbeda. Lokasi tertinggi berada di lokasi 1 yaitu di Dusun Nglanggeran Kulon dengan ketinggian 393 m dpl, suhu udara tertinggi yaitu di Dusun Nglanggeran Wetan dengan suhu 32,4 °C, kelembaban udara tertinggi berada di Dusun Gunung Buthak yaitu 77,9%, intensitas penyinaran tertinggi berada di Dusun Nglanggeran Kulon yaitu 435 lux, untuk pH tanah tertinggi berada di Dusun Nglanggeran Kulon yaitu 6,2. Kondisi lingkungan itu mendukung pertumbuhan tanaman kakao.

Dari 75 sampel yang ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar*, maka yang tumbuh ada sebanyak 6 isolat, dikarenakan banyaknya sampel yang terkontaminasi. Kemudian 6 isolat tersebut dilakukan pengamatan secara makroskopis. Jumlah isolat dari Dusun Nglanggeran Kulon berjumlah 1 isolat yaitu K1P3U5 yang berwarna putih. Jumlah isolat dari Dusun Gunung Buthak berjumlah 2 isolat, yaitu K2P2U1 dan K2P3U5 yang keduanya berwarna putih. Jumlah isolat dari Dusun Nglanggeran Wetan berjumlah 3 isolat K3P2U2, dan K3P4U5 yang berwarna putih, sedangkan K3P3U5 berwarna kuning (Gambar 1 dan Tabel 2).



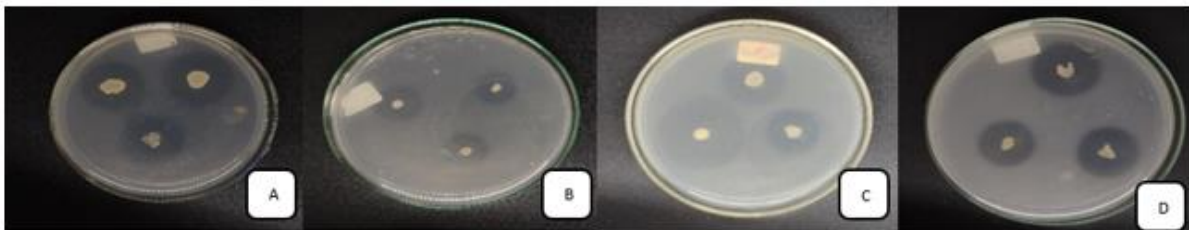
Gambar 1. Isolat koloni bakteri

Keterangan : (A) Isolat K1P3U5 (B) Isolat K2P2U1 (C) Isolat K2P3U5 (D) Isolat K3P2U2 (E) Isolat K3P2U5 (F) Isolat K3P4U5

Tabel 2. Pengamatan makroskopis bakteri yang diduga bakteri pelarut fosfat

Lokasi	Isolat	Warna Koloni
Dusun Nglanggeran Kulon	K1P3U5	Putih
Dusun Gunung Buthak	K2P2U1	Putih
	K2P3U5	Putih
	K3P2U2	Putih
Dusun Nglanggeran Wetan	K3P3U5	Kuning
	K3P4U5	Putih

Setelah dilakukan pengamatan secara makroskopis, dilakukan pengamatan zona bening yang terjadi ketika bakteri ditumbuhkan pada media *Pikovskaya*. Zona bening menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu melarutkan fosfat. Koloni bakteriyang dikelilingi zona bening menunjukkan adanya pelarutan fosfat. Dari 6 koloni bakteri yang dipindah ke media *Pikovskaya*, hanya 4 koloni bakteri yang menunjukkan zona bening (Gambar 2).

Gambar 2. Zona bening yang terbentuk pada media *Pikovskaya*

Keterangan : (A) Isolat K1P3U5 (B) Isolat K2P2U1 (C) Isolat K3P2U2 (D) Isolat K3P4U5

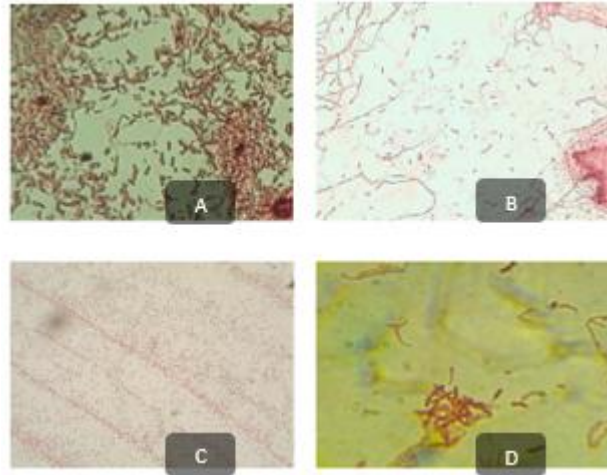
Tabel 3. Pengukuran diameter koloni zona bening

No	Isolat	Diameter zona bening (mm)		
		Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9
1	K1P3U5	12	16	20
2	K2P2U1	8	12	14
3	K3P2U2	9	11	12
4	K3P4U5	15	18	20

Pengamatan zona bening dilakukan selama 9 hari. Semakin lebar zona bening yang dihasilkan maka semakin besar juga kemampuannya untuk melarutkan fosfat. Sebaliknya jika semakin kecil zona bening yang dihasilkan maka semakin kecil juga kemampuannya untuk melarutkan fosfat. Dari 6 isolat yang menunjukkan zona bening hanya 4 isolat, yaitu K1P3U5, K2P2U1, K3P2U2 dan K3P4U5. Isolat yang memiliki zona bening lebar adalah isolat K1P3U5 dan K3P4U5 dengan diameter 20 mm yang menunjukkan bahwa isolat K1P3U5 dan K3P4U5 memiliki kemampuan melarutkan fosfat lebih besar dibanding dengan isolat lain karena semakin lebar zona bening maka kemampuan melarutkan fosfat juga semakin besar (Widyati, 2007). Sedangkan diameter zona bening terkecil yaitu pada isolat K3P2U2 dengan lebar diameter 12 mm.

Setelah pengamatan zona bening maka dilakukan pengamatan secara mikroskopis. Sebelum melakukan pengamatan mikroskopis, dilakukan pewarnaan Gram yang bertujuan agar bentuk bakteri terlihat di bawah mikroskop. Apabila bakteri berwarna merah muda maka

bakteri itu dikelompokkan gram negatif (-), dan apabila bakteri berwarna ungu maka bakteri itu dikelompokkan gram positif (+) (Wahyuni et al., 2014).



Gambar 3. Pengamatan mikroskopis bakteri pelarut fosfat

Keterangan: (A) *Acetobacter* (B) *Escherichia* (C) belum diketahui (D) *Acetobacter*

Dari hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis ciri-ciri bakteri pelarut fosfat dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Ciri-ciri bakteri pelarut fosfat

No	Isolat	Warna Koloni	Ukuran Koloni	Pewarnaan Gram	Bentuk Bakteri	Nama Bakteri
1	K1P3U5	Putih	Sedang	(-)	Batang	<i>Acetobacter</i>
2	K2P2U1	Putih	Sedang	(-)	Batang	<i>Escherichia</i>
3	K3P2U2	Putih	Sedang	(-)	Batang	-
4	K3P4U5	Putih	Sedang	(-)	Batang	<i>Acetobacter</i>

Dari pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa sel bakteri isolat K1P3U5 berbentuk batang dan berwarna merah muda (gram negatif), isolat K2P2U1 berbentuk batang dan berwarna merah muda (gram negatif) dan isolat K3P4U5 berbentuk batang dan berwarna merah muda (gram negatif). Isolat K1P3U5 dan K3P4U5 memiliki ciri-ciri yang sama dengan Genus *Acetobacter*, yaitu berbentuk batang, gram negatif dan bersifat tidak bergerak yang mempunyai permukaan dinding yang berlendir Holt 1994 (Marista et al., 2013). Isolat K2P2U1 memiliki ciri-ciri yang sama dengan Genus *Escherichia*. Bakteri *E. coli* memiliki ciri-ciri Gram negatif, warna merah muda, berbentuk batang, tersusun tunggal atau berpasangan (Trisno et al., 2019). Isolat K3P2U2 tidak teridentifikasi jenis bakterinya dikarenakan ciri-ciri yang ditemukan masih kurang.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Bakteri pelarut fosfat ditemukan pada 3 lokasi yang berbeda yaitu di Dusun Nglanggeran Kulon, Dusun Gunung Bhutak dan Dusun Nglanggeran Wetan, Desa Nglanggeran, Kec. Patuk, Kab. Gunung Kidul. Bakteri pelarut fosfat yang ditemukan adalah Genus *Acetobacter* dan *Escherichia*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bulandari, S. (2016). Pengaruh Produksi Kakao Terhadap Pertumbuhan Ekonomi Di Kabupaten Kolaka Utara. In *Laboratorium Penelitian dan Pengembangan FARMAKA TROPIS Fakultas Farmasi Universitas Muallawarman, Samarinda, Kalimantan Timur*.
- Cheng, Y., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., & Ma, Y. (2023). Phosphate-solubilizing bacteria: Their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity. *Science of The Total Environment*, 901, 166468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166468>
- Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura dan Perkebunan. (2023). *Statistik Kakao Indonesia* (Volume 7). Badan Pusat Statistik. <https://webapi.bps.go.id/download.php?f=6c6wOd2nbEyVKvh5OPUDZsU7feu9kPMcNZQ9RBpyl1msjrrc6PHQcnNuYLYieIDYUzkwaFlfCNGIYn1uIRI4fR1YzSdPflwoxj1cw0lybtMzoINGJ8tnpfGmfxN8We8ibxhtsJdx0rIQBmoGXEOIbjsRnRW/lrBw63moDUBvh4yu4CNnC6mCifkZlq7+A+54h5x/cPRLZJuIYICYWQGgT1et+a2mIJ0C3xH17rL+qhaPAsi3TzquPEnfTpP0v7/h6Z8DFtoDaF2Rs/NIYmF6pg==>
- Mardiansah, D., & Trimulyono, G. (2021). Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Potensi Bakteri Pelarut Fosfat dari Rhizosfer di Pegunungan Kapur Selatan, Tulungagung. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 10(2), 188–198. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v10n2.p188-198>
- Marista, E., Khotimah, S., & Linda, R. (2013). Bakteri Pelarut Fosfat Hasil Isolasi dari Tiga Jenis Tanah Rizosfer Tanaman Pisang Nipah ( *Musa paradisiaca* var. Nipah ) di Kota Singkawang. *Protobiont*, 2(2), 93–101.
- Oktaviani, E., Luggage, A. T., & Ferniah, R. S. (2020). Karakter Rhizobakteri Pelarut Fosfat Potensial dari Rhizosfer Tumbuhan Mangrove Teluk Awur Kabupaten Jepara secara Mikrobiologi. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 18(1), 58–66. <https://doi.org/10.14710/jil.18.1.58-66>
- Rinata, A., Himawan, A., & Nanik Kristalisasi, E. (2024). Exploration of Phosphate Solubilizing Bacteria Located Near Rubber Plant (*Hevea brasiliensis*) Field on Different Topography. *Jurnal Agronomi Tanaman Tropika (Juatika)*, 6(1). <https://doi.org/10.36378/juatika.v6i1.3033>
- Trisno, K., Tono, K. P., & Suarjana, I. G. K. (2019). Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Escherichia Coli* dari Udara pada Rumah Potong Unggas Swasta di Kota Denpasar. *Indonesia Medicus Veterinus*, 8(5), 685–694. <https://doi.org/10.19087/imv.2019.8.5.685>
- Wahyuni, S., Kirami, M. W., & Khaeruni, A. (2014). Karakterisasi Sifat Biokimia Isolat Bakteri Kitinolitik Asal Tambak Udang. *Biologi Eksperimen Dan Keanekaragaman Hayati*, 2(2), 50–55.
- Widyati, E. (2007). Formulasi Inokulum Mikroba: MA , BPF dan Rhizobium Asal Lahan Bekas Tambang Batubara untuk Bibit *Acacia Crassicarpa* Cunn. Ex-Benth. *Biodiversitas*, 8(3), 238–241.