

PENGARUH BATUAN FOSFAT DAN KERAPATAN INOKULUM TERHADAP KETAHANAN HIDUP ASPERGILLUS NIGER DAN KEMAMPUANNYA MELARUTKAN FOSFAT SETELAH DIPELETKAN DENGAN BATUAN FOSFAT

The Effect of Rock Phosphate And Level of Inoculums on The Survivability of Aspergillus niger and Its Solubilization Ability When Pelleted With Rock Phosphate

Yudi Sastro*, Donny Widiyanto, and Irfan D. Prijambada

*Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jakarta
 Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

The study is intended to examine the survival of *Aspergillus niger* and its phosphate solubilizing ability when pelleted with rock phosphate. An *A. niger* YD 17 obtained from the Laboratory of Microbiology, Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University was used. The pellet was made by mixing rock phosphate (80%) with organic matter (13.9% waste of tapioca, 6% rice bran, and 1% starch) and spore of *A. niger*. The experimental design was the Complete Randomized Design 5x4 with 3 replications. The first factor was sources of rock phosphate (Christmas Island, Jordan, China, Ciamis, and Madura). The second factor was the number of inoculums i.e. control without inoculums, 10^7 , 10^8 and 10^9 cfu.g⁻¹. The colony of *A. niger* that formed at medium of potatoes dextrose agar (PDA) and the amount of soluble phosphorus in the Pikovskaya liquid medium were parameters. Experimental results indicated that sources of rock phosphate and the number of inoculums influence the *A. niger* survivability and its phosphorus solubilizing ability. Rock phosphate from Ciamis gave the best support for fungus survival and rock phosphate from Christmas Island was the best substrate for phosphate solubilization. The highest soluble phosphate was achieved by 10^8 inoculums.

Key words: *Aspergillus niger*, rock phosphate, solubilization, survivability

PENDAHULUAN

Penggunaan batuan fosfat yang diberikan secara langsung sebagai pupuk fosfat merupakan salah satu cara untuk mengatasi mahalanya harga pupuk dan rendahnya efisiensi pemupukan menggunakan pupuk superfosfat (Bolan *et al.*, 1997; Adiningsih *et al.*, 1998; Kasno *et al.*, 1998). Namun demikian, sifat batuan fosfat yang sukar terlarut dalam air menyebabkan laju pelarutannya tidak berimbang dengan kebutuhan fosfat (P) tanaman (Hammond dan Diamond, 1987; Matunubun *et al.*, 1988; Fageria *et al.*, 1991).

Mikroba pelarut fosfat (MPF) telah dilaporkan mampu meningkatkan pelarutan batuan fosfat (Banik dan Dey, 1982; Illmer dan Schinner, 1982; Goldstein *et al.*, 1993; Goldstein, 1995; Bar-Yosef, 1998). Untuk menjamin proses pelarutan batuan fosfat oleh MPF dan memudahkan aplikasinya ditingkat lapangan maka batuan fosfat dan MPF harus digabungkan dalam satu formula pupuk fosfat. Syarat utama yang harus dipenuhi dalam mengembangkan formula pupuk fosfat yang terdiri atas gabungan batuan fosfat dan MPF adalah inokulum MPF yang disertakan harus dapat bertahan hidup dan tetap memiliki kemampuan untuk melarutkan P hingga pupuk tersebut diaplikasikan di lapangan.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat kemampuan hidup *Aspergillus niger* serta kemampuannya melarutkan P dari batuan fosfat setelah dipeletkan dengan batuan fosfat

membentuk pupuk fosfat yang disebut dengan nama biofosfat.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Batuan fosfat yang digunakan meliputi batuan fosfat Kepulauan Christmas, China, Yordania, Ciamis dan Madura. Setiap batuan fosfat diayak menggunakan saringan yang memiliki lubang saring berdiameter 2 mm. Karakteristik kimia masing-masing batuan fosfat disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kimia batuan fosfat yang digunakan dalam penelitian

Batuan Fosfat	pH-H ₂ O	Larut air (ppm)	Larut	Larut	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Mn ₂ O ₃
			sitrat 2%	HCl 25%			
-----%							
Kep. Christmas	8,2	784	8,9	32,1	1,5	4,9	tt
Cina	9,3	973	9,3	33,0	0,6	4,4	tt
Yordania	8,0	680	9,2	31,6	1,4	4,2	tt
Ciamis	8,8	754	7,8	31,7	1,9	6,0	0,03
Madura	7,8	385	0,8	17,3	3,1	5,2	0,4

tt : tidak terdeteksi.

Bahan organik yang digunakan berupa campuran tepung onggok (limbah industri tapioka), tepung sekam, dan pati dengan perbandingan berat 69,5:30:0,5. Bahan organik ini digunakan sebagai media perbanyak spora *A. niger* yang sekaligus juga digunakan sebagai bahan pembawa (*carier*) yang disertakan dalam formula pupuk pelet batuan fosfat.

Perbanyak spora *A. niger* dilakukan dalam baki-baki plastik berukuran 30x20x5 cm yang berisi 500 g media yang sebelumnya telah disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Inokulasi *A. niger* dilakukan dengan cara menuangkan *culture stock* berkepadatan 10⁵ spora.ml⁻¹ sebanyak 300 ml per kilogram media. Setelah diinokulasi, media diaduk secara merata, selanjutnya wadah perbanyak ditutup plastik bening dan diinkubasikan selama 3 minggu. Pemanenan spora dilakukan dengan cara mencampur rata bagian permukaan media yang ditumbuhi spora jamur.

Pembuatan pupuk dilakukan dengan mencampur batuan fosfat dan bahan organik yang telah disterilkan terlebih dahulu dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit dengan perbandingan berat 80:20. Bahan pupuk selanjutnya diinokulasi *A. niger* secara merata dengan kerapatan sesuai perlakuan. Sebagai bahan perekat ditambahkan kanji yang dibuat dari tepung tapioka (10 g pati.l⁻¹ air) sebanyak 10 ml per 100 g bahan pelet. Pemeletan dilakukan menggunakan mesin pemelet yang memiliki lubang pelet berdiameter 3 mm. Pelet batuan fosfat dikeringkan menggunakan kipas angin hingga kadar air pupuk mencapai 12%. Pupuk pelet selanjutnya dikemas dalam plastik bening dan disimpan pada suhu kamar.

Perancangan percobaan

Penelitian ini terdiri dua faktor perlakuan. Faktor pertama adalah asal batuan fosfat yang terdiri atas lima aras yakni batuan fosfat Kepulauan Christmas, China, Yordania, Ciamis dan Madura. Faktor kedua adalah tingkat kerapatan inokulum yang terdiri atas empat aras yakni tanpa inokulasi (kontrol), kerapatan inokulum 10⁷, 10⁸ dan 10⁹ spk (*satuan pembentuk koloni*) per gram bahan pupuk. Penelitian ditempatkan menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Pengaruh perlakuan dianalisis menggunakan uji F yang dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) pada taraf uji 5%.

Pengujian ketahanan hidup *A. Niger* dan pelarutan P

Ketahanan hidup inokulum *A. niger* dan kemampuannya melarutkan P diamati setiap 30 hari. Pengujian ketahanan hidup dilakukan menggunakan medium *potatoes dextrose agar* (PDA) dengan metode cawan tuang (*plate count*). Sementara itu, pengujian pelarutan P dilakukan dengan cara menginkubasikan 1 g sampel pupuk dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium Pikovskaya cair. Inkubasi dilakukan di atas mesin kocok berkecepatan 125 rotasi per menit selama 9 hari. Pada akhir inkubasi dilakukan pengukuran jumlah P terlarut menggunakan metode *Vanadat-Molybdat Blue* (Puslitanak, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis statistik tidak terdapat interaksi yang nyata antar perlakuan yang diujikan. Oleh sebab itu, pembahasan hasil penelitian hanya ditujukan pada pengaruh tunggal masing-masing perlakuan, yakni batuan fosfat dan tingkat penyertaan inokulum.

Ketahanan Hidup Inokulum

Pengaruh asal batuan fosfat

Asal batuan fosfat berpengaruh nyata terhadap kemampuan hidup inokulum *A. niger* yang disertakan dalam pupuk pelet batuan fosfat (Tabel 2). Namun demikian, jumlah *A. niger* yang bertahan hidup pada masing-masing batuan fosfat mengalami penurunan yang hampir sama dan cenderung stabil pada pengamatan 180 hari setelah pemeletan (HSP). Pada pengujian ini terdapat penyimpangan, yakni adanya peningkatan jumlah *A. niger* pada pelet batuan fosfat China, Ciamis, dan Madura masing-masing pada pengamatan 90, 180, dan 60 HSP.

Tabel 2. Pengaruh asal batuan fosfat terhadap ketahanan hidup *Aspergillus niger* dalam pupuk pelet batuan fosfat.

Batuan fosfat	Jumlah <i>Aspergillus niger</i> (log 10 spk.g ⁻¹ pelet)				
	30	60	90	120	180
Kep. Christmas	8,7 a	8,2 a	7,1 ab	6,6 b	6,1 b
Yordania	8,5 bc	8,0 a	6,9 bc	6,4 ab	6,4 a
China	8,2 cd	7,8 a	8,1 a	6,3 b	6,3 a
Ciamis	8,7 ab	8,0 a	7,2 ab	5,3 c	6,6 a
Madura	7,2 d	8,0 a	6,6 c	6,6 a	6,3 a

Angka-angka sekolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%.

Berdasarkan hasil pengamatan yang disajikan di atas terbukti bahwa masing-masing batuan fosfat yang diujikan dapat digabungkan dengan *A. niger*. Kandungan logam yang terdapat dalam batuan fosfat (Sedyarso, 1999) yang diduga akan dapat mempengaruhi inokulum yang disertakan dalam pelet batuan fosfat, tidak memperlihatkan pengaruh yang cukup nyata terhadap ketahanan hidup *A. niger*.

Adapun penurunan jumlah *A. niger* pada masing-masing batuan fosfat diduga berasal dari sel vegetatif yang diinokulasikan dalam pelet batuan fosfat. Pada penelitian ini inokulum diperbanyak pada media padat campuran onggok, sekam dan pati. Spora dipanen dari permukaan media dengan cara mengiris tipis permukaan media. Cara demikian menyebabkan inokulum yang diperoleh merupakan campuran spora dan sel vegetatif (miselium). Sel vegetatif bukan merupakan bentuk tahan inokulum *A. niger* serta relatif lebih mudah mengalami penurunan kemampuan hidup pada kondisi lingkungan yang ekstrim (Raper dan Fennel, 1977)

Sementara itu, peningkatan jumlah inokulum *A. niger* dalam pelet batuan fosfat China, Ciamis, dan Madura kemungkinan disebabkan oleh faktor pengeringan pelet yang tidak sempurna. Pada penelitian ini pengeringan pupuk dilakukan menggunakan kipas angin selama 24 jam. Metode pengeringan demikian diduga menyebabkan tingkat kekeringan pelet tidak merata sehingga mendorong terjadinya perkecambahan inokulum beberapa waktu

setelah perlakuan pemeletan. Perbedaan pada masing-masing batuan fosfat, kaitannya dengan metode pengeringan pupuk, kemungkinan disebabkan oleh perbedaan karakteristik batuan fosfat.

Pengaruh tingkat inokulum

Tingkat inokulum berpengaruh nyata terhadap kemampuan hidup *A. niger* yang disertakan dalam pupuk pelet batuan fosfat. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin tinggi jumlah inokulum maka jumlah *A. niger* yang bertahan hidup pada setiap pengamatan semakin besar. Namun demikian, secara statistik tidak terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan jumlah inokulum 10^7 dan 10^8 . Pada pengamatan 90 hingga 180 HSP, jumlah inokulum *A. niger* yang bertahan hidup cenderung stabil (Tabel 3). Hasil pengujian ini membuktikan bahwa terjadi mekanisme peningkatan ketahanan hidup inokulum seiring dengan semakin tingginya tingkat penyertaan inokulum dalam pelet batuan fosfat.

Tabel 3. Pengaruh jumlah inokulum terhadap ketahanan hidup *Aspergillus niger* dalam pupuk pelet batuan fosfat

Kerapatan inokulum (spk.g ⁻¹ pelet)	Jumlah <i>Aspergillus niger</i> (log 10 spk.g ⁻¹ pelet)				
	30	60	90	120	180
10 ⁷	6,3 b	6,3 b	5,6 b	5,1 b	5,5 b
10 ⁸	7,0 b	7,0 b	6,0 b	6,1 b	6,1 b
10 ⁹	9,0 a	8,5 a	7,5 a	7,5 a	7,4 a

Angka-angka sekolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%.

Kemampuan Pelarutan P

Pengaruh asal batuan fosfat

Secara statistik asal batuan fosfat berpengaruh nyata terhadap jumlah P yang terlarutkan oleh *A. niger* dalam medium Pikoskaya cair (Tabel 4). Jumlah P terlarut terbesar terdapat pada pupuk pelet batuan fosfat Kepulauan Christmas, diikuti oleh batuan fosfat Madura dan Yordania, sedangkan jumlah P terlarut terkecil terdapat pada batuan fosfat Ciamis (Tabel 4). Perbedaan tingkat pelarutan P tersebut, kaitannya dengan metabolit yang sekresikan *A. niger* dalam hal ini adalah asam-asam organik, diduga disebabkan oleh perbedaan mineralogi batuan fosfat sebagaimana dilaporkan oleh Kpombekou dan Tabatabai (1994).

Tabel 4. Pengaruh asal batuan fosfat penyusun pupuk pelet batuan fosfat terhadap tingkat pelarutan P-nya dalam medium Pikovskaya cair.

Batuan fosfat	Fosfat (P ₂ O ₅) terlarut (µg.ml ⁻¹)				
	30	60	90	120	180
Kepulauan Christmas	16,44 b	22,72 b	47,59 a	46,38 a	53,23 a
Yordania	32,59 a	36,33 a	34,75 b	36,14 b	40,34 b
China	6,58 c	31,96 a	31,85 b	34,06 b	32,41 bc
Ciamis	8,81 c	16,14 c	21,43 c	24,80 c	28,22 c
Madura	12,33 bc	20,74 b	42,06 a	46,28 a	51,61 a

Angka-angka sekolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%.

Pengaruh tingkat inokulum

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap tingkat pelarutan P, terdapat tiga hal yang menonjol yakni inokulasi *A. niger* secara statistik nyata meningkatkan jumlah P yang terlarut dari pupuk batuan fosfat pada saat di inkubasi dalam medium Pikovskaya cair, terjadi penurunan jumlah P terlarut sejalan dengan semakin tinggi jumlah inokulum, dan terdapat peningkatan jumlah P terlarut pada setiap perlakuan tingkat inokulum *A. niger* seiring semakin lamanya masa penyimpanan (Tabel 5).

Tabel 5. Pengaruh tingkat inokulum *Aspergillus niger* yang disertakan dalam pupuk pelet batuan fosfat terhadap tingkat pelarutan fosfat dalam medium Pikovskaya cair

Kerapatan Inokulum (spk.g ⁻¹ pelet)	Fosfat (P ₂ O ₅) terlarut (µg.ml ⁻¹)				
	30	60	90	120	180
Tanpa Inokulasi	5,50 c	5,88 b	5,91 c	5,76 b	5,61 b
10 ⁷	25,32 a	32,10 a	57,25 a	51,40 a	56,09 a
10 ⁸	16,37 b	32,30 a	46,45 a	53,77 a	58,03 a
10 ⁹	9,91 bc	31,52 a	32,54 b	39,21 a	44,93 a

Angka-angka sekolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%.

Sebagaimana telah dilaporkan sebelumnya bahwa *A. niger* memiliki kemampuan mensekresi asam-asam organik berberat molekul rendah, khususnya sitrat (Ul-Haq *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2002; Sastro *et al.*, 2006). Asam organik terbukti mampu melarutkan P dari batuan fosfat (Kpombekou dan Tabatabai, 1994). Pada penelitian ini, tingkat pelarutan P dari pupuk pelet batuan fosfat yang telah diinokulasi *A. niger* dalam medium Pikovskaya cair berkisar 9,91 hingga 58,03 ppm. Hasil pengujian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Thomas *et al.* (1985), Asmarlaili *et al.* (1995), dan Ernita (1998).

Penurunan tingkat pelarutan P seiring dengan peningkatan jumlah inokulum dan peningkatan tingkat pelarutan P seiring semakin lama masa penyimpanan, sebagaimana terjadi pada penelitian ini, berhubungan dengan jumlah *A. niger*. Peningkatan jumlah inokulum *A. niger* menyebabkan peningkatan pembentukan massa jamur dalam medium. Peningkatan massa jamur menyebabkan peningkatan konsumsi P yang terlarutkan oleh *A. niger* sehingga P dalam larutan menjadi berkurang (*data dalam persiapan publikasi*).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa asal batuan fosfat dan tingkat penyertaan inokulum *Aspergillus niger* dalam pupuk pelet batuan fosfat nyata mempengaruhi ketahanan hidup inokulum dan kemampuannya melarutkan fosfat. Tingkat inokulum *A. niger* yang paling mendukung ketahanan hidup dan

kemampuannya melarutkan fosfat berkisar pada kerapatan 10^8 hingga 10^9 spk.g⁻¹ pupuk, sedangkan batuan fosfat yang paling mendukung kemampuan hidup inokulum *A. niger* dan kemampuannya melarutkan fosfat masing-masing adalah batuan fosfat Ciamis dan batuan fosfat Kepulauan Christmas.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiningsih, S., Undang, K. dan S. Rochayati. 1998. Prospek dan kendala penggunaan P-alam untuk meningkatkan produksi tanaman pangan pada lahan masam marginal. *Dalam Pertemuan Pembahasan dan Komunikasi Hasil Penelitian Tanah dan Agroklimat*. Bogor. 10 Februari.
- Ali, S., I. Ul-Haq and J. Iqbal. 2002. The role of Mn⁺⁺ ions for high and consistent yield of citric acid in recycling fed-batch bioreactor system and its novelty on kinetic basis. www.ejbbiotechnology.info/content/vol5/PDF. 13 Februari 2005.
- Asmarlaili, S. Hanafiah, dan T.M.H. Oelieim. 1995. Keefektifan mikroorganisme pelarut fosfat yang diisolasi dari berbagai tanah masam di Sumatera Utara. *Jurnal Penelitian Pertanian 14(1)*:11-19.
- Banik, S. and B.K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. *Plant and Soil 69*:353-364.
- Bar-Yosef, B., R.D. Rogers, J.H. Wolfram, and E. Richman. 1998. *Pseudomonas capacia*-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1704-1708.
- Bilgrami, K.S. and R.N. Verma. 1978. *Physiology of Fungi*. Vikas Publishing House PVT Ltd. New Dehli.
- Bolan, N.S., J. Elliot; P.E.H. Gregg and S. Well. 1997. Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils 24*: 169-174.
- Ernita. 1998. Uji potensi mikroorganisme pelarut fosfat pada medium Pikovskaya. *Jurnal Penelitian Pertanian 17*:54-58.
- Fageria, N.K., V.C. Baligar and R.J. Wright. 1991. Influence of phosphate rock source and rates on rice and common bean production in an Oxisol. *Plant and Soil 134*: 137-144.
- Goldstein, A.H., R.D. Rogers and G. Mead. 1993. Mining by Microbe. Separating phosphate from ores via bioprocessing. *Bio/Technology 11*:1250-1254.
- Goldstein, A.H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture 12*:185-193.
- Hammond, L.L. and R.B. Diamond. 1987. Effectiveness of alternative phosphate fertilizer in tropical agriculture. *Prosiding Lokakarya Nasional Penggunaan Pupuk Fosfat*. Puslitanak. Bogor.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1982. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24:389-395.
- Kasno, A., S. Adiningsih dan M. Sedyarso. 1998. Keefektifan waktu pemberian dan jenis fosfat alam pada tanah plinthic kandiudults. *J. Tanah Tropika 7*:59-73.
- Kpombekou, A. and M.A. Tabatabai. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci. 158*: 443-453.
- Matunubun, H., B. Radjaguguk dan A. Rosmarkam. 1988. Kajian pengaruh peningkatan pH tanah Podsolik Merah Kuning atas pengambilan fosfor dari batuan fosfat oleh padi gogo. *BPPS-UGM 3-1*.
- Puslitanak. 1998. *Penuntun Analisa Kimia Tanah dan Tanaman*. Pusat Penelitian Tanah dan Agroklimat. Bogor.
- Raper, K.B. and D.I. Fennel. 1977. *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing. Huntington. New York.
- Sedyarso, M. 1999. *Fosfat Alam Sebagai Bahan Baku dan Pupuk Fosfat*. Pusat Penelitian Tanah dan Agroklimat. Bogor.
- Thomas, G. V., M. V. Shantaram, and N. Sharaswathy. 1985. Occurrence and activity of phosphate-solubilizing fungi from coconut plantation soils. *Plant and Soil 87*: 357-364.
- Ul-Haq, I., S. Ali, M. A. Qadeer and J. Iqbal. 2002. Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. www.ejbbiotechnology.info/content/vol5/pdf.