

VIABILITAS DAN AKTIVITAS ENZIM FOSFATASE SERTA PRODUKSI ASAM ORGANIK BAKTERI PELARUT FOSFAT PADA BEBERAPA SUHU SIMPAN

Ajeng Widakusuma Dewanti¹, Ety Pratiwi², Yulia Nuraini^{*}

¹ Jurusan Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya

² Balai Penelitian Tanah, Bogor

* penulis korespondensi: ynuraini@ub.ac.id

Abstract

Phosphate is the second essential chemical element for plants. However, it mostly presents in insoluble form. Using biofertilizers containing phosphate-solubilizing bacteria can increase phosphate solubilization. However, it is often ineffective due to the high temperature of the storage warehouse so the viability and enzyme activity of the microbes can decrease. The aims of this study were to determine the optimum and maximum temperature of phosphate-solubilizing bacteria's viability, knowing the effect of storage temperature on the bacteria population and halozone of phosphate-solubilizing bacteria, knowing phosphatase activity of phosphate-solubilizing bacteria which were incubated at high temperatures, and knowing the organic acid production of phosphate-solubilizing bacteria which incubated at high temperature. The results showed that 37°C was the optimum temperature of JBNO6, KT6D, KT7D and EPS5 strains and they could hold the high temperature of 58°C (thermophilic). The ability of all strains in dissolving the P-insoluble decreased at high temperatures. However, the enzyme activity would go back again at room temperature (reversible). The acid phosphatase value of all phosphate-solubilizing bacteria strains was higher than the alkaline phosphatase value in the entire storage temperature. At high temperatures, KT6D was capable of producing oxalic acid and KT7D was able to produce acetic acid. EPS5 was the highest in the ability of phosphate solubilizing, the ability to produce the phosphatase enzyme and the bacteria population compared with JBNO6, KT6D and KT7D.

Keywords: organic acids, phosphate-solubilizing bacteria, phosphatase, storage temperature

Pendahuluan

Fosfat merupakan unsur esensial kedua setelah nitrogen yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Pada dasarnya, jumlah fosfat dalam tanah lebih banyak dibandingkan dengan nitrogen. Jumlahnya dalam tanah sekitar 95% hingga 99%, namun terdapat dalam bentuk yang tidak larut sehingga tidak dapat digunakan oleh tanaman (Vassileva *et al.*, 1998).

Upaya yang dilakukan untuk memenuhi kebutuhan fosfat tanaman adalah dengan pemupukan fosfat, anorganik maupun organik. Akan tetapi Isgitani (2005) menyatakan bahwa

hanya sekitar 15-20% unsur fosfat dari pemberian pupuk fosfat yang dapat diserap oleh tanaman, sedangkan 80-85% unsur fosfat terjerap oleh koloid tanah. Pada tanah dengan pH tinggi, fosfat akan terikat oleh kalsium dan magnesium membentuk ikatan Ca-P dan Mg-P, sedangkan pada tanah dengan pH rendah, fosfat diikat oleh aluminium dan besi membentuk ikatan Al-P dan Fe-P (Elfiati, 2005).

Saat ini efisiensi pemupukan fosfat dapat dilakukan dengan memanfaatkan mikroba pelarut fosfat sebagai pupuk hayati, salah satunya adalah bakteri pelarut fosfat (BPF). Menurut Santosa (2007), sebagian aktivitas

mikroba 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. Elfiati (2005) mengemukakan keunggulan penggunaan mikroba pelarut fosfat sebagai pupuk hayati: hemat energi, tidak mencemari lingkungan, mampu membantu meningkatkan kelarutan P yang terjerap, menghalangi terjerapnya P pupuk oleh unsur-unsur penjerap, dan mengurangi toksisitas Al^{3+} , Fe^{3+} , dan Mn^{2+} terhadap tanaman pada tanah masam.

Pada jenis-jenis tertentu, mikroba ini dapat memacu pertumbuhan tanaman karena menghasilkan zat pengatur tumbuh, serta menahan penetrasi patogen akar karena sifat mikroba yang cepat mengkolonisasi akar dan menghasilkan senyawa antibiotik. Akan tetapi penggunaan pupuk hayati yang mengandung BPF ini seringkali tidak dapat digunakan secara efektif. Hal ini diantaranya diakibatkan oleh penyimpanan yang tidak memadai. Biasanya pupuk hayati disimpan di gudang yang tidak dilengkapi dengan pendingin atau *refrigerator*, bahkan ada kalanya suhu di gudang tersebut cukup tinggi membuat viabilitas mikroba pada pupuk hayati menjadi menurun.

Hal ini didukung oleh pernyataan Rofi'i (2009) yang menjelaskan jika kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan melakukan aktivitas enzimatik dipengaruhi oleh suhu dan lama penyimpanan. Suhu tinggi umumnya menurunkan viabilitas dan aktivitas enzim serta

produksi asam organik pada mikroba yang ada di dalam pupuk hayati. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui suhu optimum dan maksimum viabilitas bakteri pelarut fosfat, mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap populasi dan luas zona bening bakteri pelarut fosfat, mengetahui aktivitas fosfatase bakteri pelarut fosfat yang diinkubasi pada suhu tinggi, serta mengetahui produksi asam organik bakteri pelarut fosfat yang diinkubasi pada suhu tinggi.

Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2015. Kegiatan analisis biologi dilakukan di Laboratorium Biologi dan Kesehatan Tanah, analisis kimia (enzim fosfatase) dilakukan di Laboratorium Kimia dan Kesuburan Tanah, Balai Penelitian Tanah (Balittanah), serta analisis kimia (asam organik) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor. Penelitian ini menggunakan isolat bakteri pelarut fosfat yang merupakan koleksi dari Laboratorium Biologi dan Kesehatan Tanah, Balai Penelitian Tanah, Bogor. Suhu inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah suhu ruang ($30^{\circ}C$), suhu $37^{\circ}C$, suhu $44^{\circ}C$, suhu $51^{\circ}C$, suhu $58^{\circ}C$, dan suhu $58^{\circ}C$ yang dikembalikan ke suhu ruang ($30^{\circ}C$). Karakteristik isolat yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik isolat yang digunakan

No	Nama Isolat	Asal Wilayah	Jenis Sampel	pH Asal
1.	JBNO6	Kabupaten Indramayu, Propinsi Jawa Barat	Tanah sawah	6,74
2.	KT6D	Kecamatan Marabahan, Kabupaten Barito Kuala, Propininsi Kalimantan Selatan	Endofitik akar gelam, tanah rawa sulfat masam	2,82
3.	KT7D	Kecamatan Marabahan, Kabupaten Barito Kuala, Propininsi Kalimantan Selatan	Endofitik purun tikus, tanah rawa sulfat masam	3,55
4.	EPS5	Kecamatan Pangeran, Kabupaten Cirebon, Propinsi Jawa Barat	Tanah sawah	4,00

Kegiatan penelitian meliputi karakterisasi morfologi koloni bakteri pelarut fosfat, pengujian kemampuan pelarutan bakteri pelarut fosfat pada beberapa suhu inkubasi, pengujian sifat enzim, pengujian bakteri pelarut fosfat dalam menghasilkan enzim fosfatase, pengujian produksi asam organik bakteri pelarut fosfat, serta pengukuran pertumbuhan populasi bakteri pelarut fosfat.

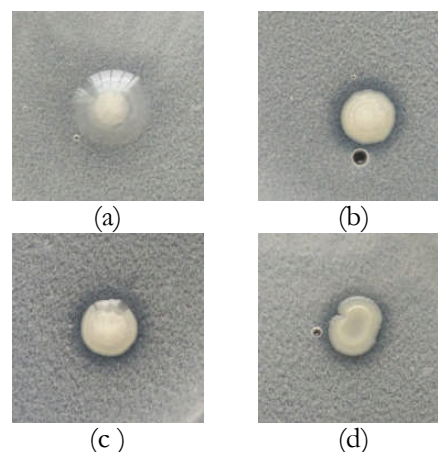
Parameter yang diamati meliputi parameter kualitatif dan kuantitatif. Parameter kuantitatif adalah pengamatan karakteristik morfologi bakteri pelarut fosfat dengan metode Hadioetomo (1993), dan pengujian sifat enzim yang diamati secara mikroskopis. Parameter kuantitatif yang diamati adalah aktivitas bakteri (zona bening pada suhu inkubasi, dan indeks pelarutan fosfat), kandungan enzim fosfatasi (metode Tabatabai dan Bremner (1969), viabilitas bakteri (kandungan asam organik), dan populasi bakteri pelarut fosfat dengan metode *total plate count*.

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi morfologi koloni BPF

Isolat BPF diinokulasikan pada media Pikovskaya padat. Selanjutnya dilakukan karakterisasi terhadap morfologi koloni bakteri sesuai dengan prosedur Hadioetomo (1993) yang meliputi bentuk, tepian, elevasi, dan warna bakteri (Gambar 1 dan Tabel 2). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki karakteristik morfologi

yang berbeda. Jika diamati, tampak perbedaan yang mencolok antara isolat JBNO6 dengan ketiga isolat BPF yang lain berupa adanya lendir di sekitar koloni. Lapisan lendir (*slime*) pada bakteri adalah material kapsul yang disekresikan oleh bakteri pada media pertumbuhannya (Yulianti, 2013). Fungsi dari lapisan lendir bakteri adalah untuk melindungi bakteri dari lingkungan yang membahayakan (misalnya kekeringan), menangkap nutrisi dan air, memungkinkan koloni bakteri bertahan pada proses sterilisasi kimiawi (misalnya pemberian klorin, iodin), serta memungkinkan bakteri menempel pada permukaan yang licin (Karomah, 2015).



Gambar 1. Morfologi koloni BPF (a) JBNO6 (b) KT6D (c) KT7D (d) EPS5

Tabel 2. Karakterisasi morfologi BPF

Ciri Koloni	Morfologi Koloni			
	JBNO6	KT6D	KT7D	EPS5
Bentuk	Bundar	Bundar dengan tepian timbul	Keriput	Keriput
Tepian	Licin	Licin	Berombak	Berombak
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Seperti kawah
Warna	Putih	Putih	Putih	Putih

Kemampuan pelarutan BPF pada Beberapa Suhu Inkubasi

Pengujian kemampuan pelarutan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening serta indeks pelarutan (IP) fosfatnya. Berdasarkan

hasil yang didapat, diketahui bahwa isolat yang diuji akan mengalami perubahan diameter zona bening akibat adanya peningkatan suhu inkubasi. Isolat JBNO6, KT6D, dan KT7D memiliki diameter zona bening optimum pada suhu 37°C. Sedangkan isolat EPS5 memiliki

diameter zona bening optimum pada suhu ruang (30°C (Tabel 3). Keseluruhan isolat mengalami penurunan memiliki diameter zona bening setelah suhu optimum. Setelah inkubasi (48-72 jam), potensi mikroba untuk melarutkan fosfat tidak tersedia secara kualitatif dicirikan oleh zona bening (halozone) di sekitar koloni mikroba yang tumbuh pada agar trikalsium fosfat (Ginting *et al.*, 2006).

Tabel 3. Diameter zona bening

Suhu	Diameter Zona Bening (mm)			
	JBNO6	KT6D	KT7D	EPS5
30°C	1,6	1,4	1,6	2,0
37°C	1,8	1,6	1,7	1,9
44°C	1,1	0,9	1,0	1,3
51°C	0,7	0,6	0,6	0,8
58°C	0,1	0,3	0,2	0,3

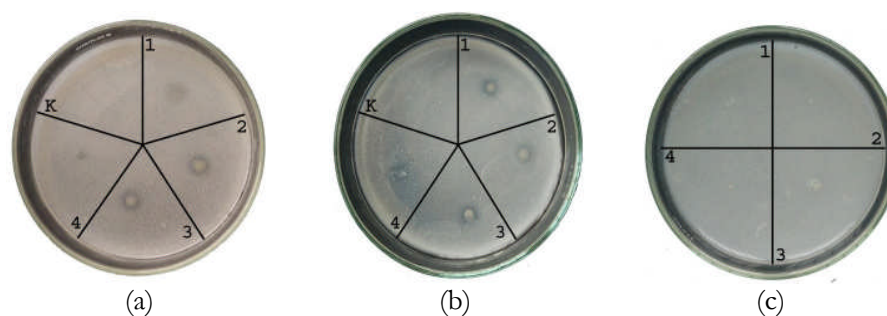
Berdasarkan hasil yang didapat, diketahui bahwa seluruh isolat bakteri memiliki IP tertinggi pada suhu 37°C dan semakin menurun pada suhu berikutnya (Tabel 4). Menurut Isroi (2008), beberapa faktor yang mempengaruhi indeks pelarutan fosfat, antara lain: (a) konsentrasi sumber fosfat yang tidak larut dengan sempurna; (b) ketebalan agar; (c) kecepatan pertumbuhan mikroba dan kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat; (d) indeks pelarutan fosfat kurang sesuai untuk membandingkan antar kelompok mikroba.

Tabel 4. Indeks pelarutan fosfat

Suhu	Indeks Pelarutan			
	JBNO6	KT6D	KT7D	EPS5
30°C	1,14	1,16	1,18	1,26
37°C	1,30	1,37	1,33	1,33
44°C	1,22	1,19	1,21	1,18
51°C	1,15	1,09	1,11	1,17
58°C	1,02	1,06	1,04	1,07

Sifat Enzim

Pengujian sifat enzim dilakukan untuk mengetahui apakah enzim bersifat dapat kembali (*reversible*) atau tidak dapat kembali (*irreversible*). Pengujian dilakukan dengan menginkubasi isolat bakteri yang sebelumnya telah diinkubasi pada suhu maksimum di media Pikovskaya padat (58°C) ke suhu ruang melalui dua cara, yaitu tetap menggunakan media lama lalu menginkubasinya pada suhu ruang dan memindahkan bakteri dari media lama ke media baru lalu menginkubasinya pada suhu ruang. Isolat pada media lama dengan masa inkubasi 72 jam pada suhu ruang tampak adanya pertumbuhan koloni dan diameter zona bening yang bertambah besar dan jelas jika dibandingkan dengan isolat pada media lama yang diinkubasi pada suhu 58°C (Gambar 2). Isolat yang dipindah pada media baru dengan masa inkubasi 1 minggu pada suhu ruang tampak adanya pertumbuhan koloni BPF.



Gambar 2. Hasil pengujian sifat enzim (a) bakteri yang diinkubasi selama 72 jam pada suhu 58°C (b) bakteri yang diinkubasi tanpa pemindahan media selama 72 jam pada suhu ruang (c) bakteri yang diinkubasi dengan pemindahan media selama 7 hari pada suhu ruang (1) isolat JBNO6 (2) isolat KT6D (3) isolat KT7D (4) isolat EPS5 (K) kontrol negatif

Akan tetapi, tidak terdapat adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh. Perbedaan tersebut bisa terjadi karena pada media lama isolat bakteri tidak perlu melakukan adaptasi dengan media hidupnya, sedangkan pada media baru isolat bakteri perlu beradaptasi kembali dengan lingkungan yang baru. Penelitian yang dilakukan oleh Saragih (2013) memberikan informasi bahwa dari lima isolat BPF (isolat pvk-5a, pvk-5b, pvk-6b, pvk-7a dan pvk-8a) yang sebelumnya ditumbuhkan pada media Pikovskaya, tidak ada satupun dari isolat tersebut yang tumbuh setelah dipindah ke media vinasse murni.

Kemampuan BPF dalam Menghasilkan Enzim Fosfatase

Dalam penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap fosfomonoesterase yang meliputi fosfatase asam dan fosfatase alkalin, sesuai dengan metode Tabatabai dan Bremner (1969).

Pengelompokkan ini didasarkan pada pH optimum enzim, sebagian bekerja optimum pada pH asam dan sebagian pada pH alkalin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa keseluruhan isolat memiliki kandungan enzim fosfatase asam yang paling tinggi pada suhu 37°C dan semakin berkurang hingga suhu 58°C (Tabel 5). Akan tetapi, ketika hasil inkubasi pada suhu 58°C dikembalikan pada suhu ruang, kandungan enzim fosfatase asam naik. Jika keempat isolat dibandingkan, isolat EPS5 memiliki kandungan enzim fosfatase asam yang paling tinggi diantara isolat BPF yang lain untuk tiap suhu inkubasi. Sedangkan isolat KT6D memiliki kandungan enzim fosfatase asam yang paling rendah dibanding ketiga isolat yang lainnya. Mulai pada suhu rendah, aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai aktivitas optimumnya dicapai. Menurut Pelczar (2010), suhu akan mempengaruhi aktivitas enzim.

Tabel 5. Nilai fosfatase asam

Suhu	Fosfatase Asam (ppm)			
	JBNO6	KT6D	KT7D	EPS5
30°C	23,266	21,059	22,500	25,554
37°C	23,874	21,982	22,901	26,414
44°C	18,919	17,568	17,838	19,459
51°C	16,216	11,892	14,459	17,973
58°C	8,342	7,505	8,072	9,617
58°C dikembalikan ke 30°C	13,288	14,279	14,369	14,595

Selanjutnya dijelaskan bahwa kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas dan pada akhirnya merusak enzim. Hasil tersebut menunjukkan bahwa keseluruhan isolat memiliki kandungan enzim fosfatase alkalin yang paling tinggi pada suhu 37°C dan semakin berkurang hingga suhu 58°C, sama halnya dengan kandungan enzim fosfatase asam. Akan tetapi, ketika hasil inkubasi pada suhu 58°C dikembalikan kembali pada suhu ruang, hanya isolat KT6D dan KT7D yang kandungan enzim fosfatase alkalinya naik (Tabel 6).

Pelczar (2010) menjelaskan bahwa suhu memang mempengaruhi aktivitas masing-masing enzim dan besarnya produksi setiap enzim oleh sel. Namun selanjutnya dijelaskan

jika hal ini tidak berarti sama untuk setiap enzim dengan alasan bahwa selama pertumbuhan aktivitas atau respons diukur sebagai aktivitas total yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bila semua enzim dan sistem enzim berfungsi secara harmonis di dalam sel. Jika dibandingkan antara enzim fosfatase asam dan enzim fosfatase alkalin, hasil pengukuran menunjukkan nilai enzim fosfatase asam yang lebih tinggi untuk keempat isolat yang diuji. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri akan bekerja optimum pada pH asam. Stevenson dan Cole (1999) menyatakan bahwa fosfatase asam berperan optimum pada pH 4-6, sedangkan fosfatase alkalin berperan optimum pada pH 9-11.

Tabel 6. Nilai fosfatase alkalin

Suhu	Fosfatase Alkalin (ppm)			
	JBNO6	KT6D	KT7D	EPS5
30°C	3,784	4,000	4,270	5,243
37°C	6,577	7,613	7,703	10,405
44°C	3,108	3,784	4,189	5,135
51°C	2,432	3,649	3,919	4,189
58°C	2,468	2,261	1,964	3,518
58°C dikembalikan ke 30°C	1,149	2,973	2,568	2,703

Dilihat dari karakteristik isolat yang digunakan (Tabel 1) empat isolat yang digunakan berasal dari tanah yang bersifat masam. Sehingga, pada dasarnya, jumlah fosfatase asam lebih dominan dibandingkan dengan jumlah fosfatase alkalin. Hal ini dipertegas oleh hasil yang diungkapkan oleh Djuniwati *et al.* (2007) yang menyatakan jika pada tanah masam fosfatase asam lebih dominan daripada alkalin.

Produksi Asam Organik BPF

Pengukuran nilai asam organik yang dihasilkan oleh isolat BPF dilakukan pada isolat yang telah diinkubasi suhu ruang 30°C, 58°C, dan suhu

58°C yang dikembalikan ke suhu ruang (Tabel 7). Hasil tersebut menunjukkan bahwa setiap isolat BPF mampu menghasilkan kandungan asam organik yang berbeda-beda dengan jumlah yang berbeda pula. Isolat BPF yang diinkubasi pada suhu yang berbeda akan menghasilkan kandungan asam organik yang berbeda pula. Kandungan asam organik yang dihasilkan tinggi pada suhu ruang dan akan berkurang (seperti isolat KT6D yang menghasilkan asam oksalat dan KT7D yang menghasilkan asam asetat) bahkan hilang sama sekali pada suhu 58°C.

Tabel 7. Produksi asam organik

Isolat	Suhu	Kandungan Asam Organik (ppm)				
		Sitrat	Oksalat	Asetat	Malat	Propionat
JBNO6	Ruang (30°C)	2,06	14,02	16,73	104,78	ttd
	58°C	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	58°C dikembalikan suhu ruang	ttd	5,35	14,22	42,51	ttd
KT6D	Ruang (30°C)	19,30	12,49	40,70	ttd	18,87
	58°C	ttd	7,68	ttd	ttd	ttd
	58°C dikembalikan suhu ruang	9,59	7,48	28,65	ttd	10,25
KT7D	Ruang (30°C)	16,08	15,35	20,35	ttd	ttd
	58°C	ttd	ttd	6,25	ttd	ttd
	58°C dikembalikan suhu ruang	7,32	6,25	11,46	ttd	ttd
EPS5	Ruang (30°C)	1,03	7,68	17,54	ttd	ttd
	58°C	ttd	ttd	ttd	ttd	ttd
	58°C dikembalikan suhu ruang	ttd	2,37	8,69	ttd	ttd

Keterangan : ttd = tidak terdeteksi

Subba-Rao (1994) mengungkapkan bahwa mikroba pelarut fosfat mensekresikan sejumlah asam organik seperti asam-asam format, asetat, propionat, laktonat, glikolat, fumarat dan suksinat yang mampu membentuk khelat dengan kation-kation seperti Ca dan Fe serta berakibat pada pelarutan fosfat yang efektif.

Pertumbuhan Populasi BPF

Pengukuran pertumbuhan populasi BPF menggunakan metode *total plate count* yang dilakukan dengan menghitung jumlah koloni BPF yang terbentuk. Berdasarkan hasil yang didapat diketahui jika seluruh isolat BPF yang

diuji akan mengalami perubahan jumlah populasi bakteri akibat adanya peningkatan suhu inkubasi. Rata-rata jumlah tertinggi ditunjukkan isolat KT6D yang dilanjutkan oleh isolat EPS5, KT7D, dan JBNO6. Keempat isolat menunjukkan jumlah populasi tertinggi pada suhu inkubasi 37°C dan semakin berkurang pada tiap suhu inkubasi hingga hilang sama sekali pada suhu 58°C (Tabel 9). Setelah isolat bakteri yang telah diinkubasi pada suhu 58°C dan dikembalikan pada suhu ruang jumlah populasi pada keseluruhan isolat tidak mengalami perubahan.

Tabel 9. Jumlah populasi

Suhu	Jumlah Populasi (log cfu mL ⁻¹)			
	JBNO6	KT6D	KT7D	EPS5
30°C	13,22	13,57	13,24	13,36
37°C	13,27	13,76	13,56	13,77
44°C	6,60	8,60	5,78	6,90
51°C	5,90	5,78	5,85	6,60
58°C	0,00	0,00	0,00	0,00
58°C dikembalikan ke 30°C	0,00	0,00	0,00	0,00

Hal ini diperkirakan akibat adanya proses pengenceran dalam metode penghitungan populasi bakteri. Hasil penelitian yang dilakukan Suriani *et al.* (2013) diketahui bahwa keseluruhan isolat bakteri dari genus *Pseudomonas* dapat tumbuh pada rentang suhu 20-40°C. Selanjutnya dijelaskan bahwa bakteri dari genus tersebut umumnya tumbuh optimal pada suhu 37-40°C, namun ada yang tumbuh optimum pada rentang dibawah suhu tersebut.

Kesimpulan

Seluruh isolat bakteri pelarut fosfat yang diuji memiliki suhu optimum 37°C dan dapat bertahan hidup pada suhu tinggi, 58°C (bersifat termofilik). Seluruh isolat bakteri pelarut fosfat mengalami penurunan jumlah populasi serta kemampuannya dalam melarutkan P sukar larut (yang ditunjukkan dengan luas zona bening) ketika diinkubasi pada suhu tinggi sebagai akibat adanya hilangnya kemampuan bakteri menghasilkan asam-asam organik. Aktivitas enzim fosfatase pada isolat bakteri pelarut

fosfat yang diuji bersifat *reversible*. Aktivitas enzim fosfatase tersebut mengalami penurunan pada suhu inkubasi tinggi (58°C) dan akan kembali lagi aktivitasnya jika disimpan dalam suhu ruang. Isolat bakteri pelarut fosfat tertentu mampu menghasilkan asam organik pada suhu tinggi, seperti isolat KT6D yang menghasilkan asam oksalat dan KT7D yang menghasilkan asam asetat. Isolat EPS5 merupakan isolat yang dapat dikembangkan lebih lanjut jika dilihat dari pengamatan mengenai kemampuan pelarutan fosfat, kemampuan menghasilkan enzim fosfatase dan jumlah populasi.

Daftar Pustaka

- Djuniwati, S., Pulunggono, H.B. dan Suwarno. 2007. Pengaruh pemberian bahan organik (*Centrosema pubescens*) dan fosfat alam terhadap aktivitas fosfatase dan fraksi P tanah Latosol di Darmaga, Bogor. *Jurnal Tanah dan Lingkungan* 9(1),10-15.

- Elfiati, D. 2005. Peranan Mikroba Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan Tanaman. E-USU Repository. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Ginting, R.C.B., Saraswati, R. dan E. Husen, E. 2006. Mikroorganisme Pelarut Fosfat. Pupuk Organik dan Pupuk Hayati. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor. pp. 141-158.
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. PT. Gramedia. Jakarta.
- Isgitani, M., Kabirun, S. dan Siradz, S.A. 2005. Pengaruh inokulasi bakteri pelarut fosfat terhadap pertumbuhan shorghum pada berbagai kandungan P Tanah. Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan 5(1), 48-54.
- Isroi. 2008. Uji Mikroba Pelarut Fosfat 1. <http://isroi.com/2008/03/13/uji-mikroba-pelarut-fosfat-1/>. (Diakses pada tanggal 20 Juni 2015).
- Karomah, L. 2015. Struktur Eksternal Sel Bakteri. <http://hariansains.web.unej.ac.id/2015/02/28/struktur-eksternal-sel-bakteri/>. (Diakses pada tanggal 22 Juni 2015).
- Pelczar, M. J. 2010. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Rofi'i, F. 2009. Hubungan Antara Jumlah Total Bakteri dan Angka Katalase Terhadap Daya Tahan Susu. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Santosa, E. 2007. Mikroba Pelarut Fosfat. Metode Analisis Biologi Tanah. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. Bogor. pp. 39-52.
- Saragih, A.B. 2013. Skrining Bakteri Pelarut Fosfat Adaptif Vinasse Dari Lahan Tebu Pabrik Gula Jatiroto Kabupaten Lumajang Jawa Timur. Skripsi. Universitas Jember.
- Stevenson, F.J. dan M.A. Cole. 1999. Cycle of Soil Carbon, Nitrogen Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. Canada.
- Subba-Rao, N.S. 1994. Soil Microorganisms and Plant Growth. 2nd Edition. New Hampshire. New Delhi.
- Suriani, S., Soemarno dan Suharjo. 2013. Pengaruh suhu dan pH terhadap laju pertumbuhan lima isolat bakteri anggota genus *Pseudomonas* yang diisolasi dari ekosistem sungai tercemar deterjen di sekitar kampus Universitas Brawijaya. Jurnal Pembangunan Alam Lestari 3(2), 58-62.
- Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biolgy and Biochemistry 1, 301-307.
- Vassileva, M., Vassilev, N. and Azcon, R. 1998. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14, 281-284.
- Yulianti, N.F.E. 2013. Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis*. Naskah Publikasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.