

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PELARUT FOSFAT DARI TANAH RAWA DENGAN TINGKAT KEMASAMAN YANG TINGGI

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHATE SOLVING BACTERIA FROM SWAMP SOIL WITH HIGH LEVELS OF ACIDITY

Galang Indra Jaya^{1a}, Sri Nuryani Hidayah Utami², Jaka Widada², Wahida Annisa Yusuf³, Saipul Abbas⁴, Nur Fatturahman Ridwan⁵, Amir Noviyanto¹

¹ Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian INSTIPER Yogyakarta.

²Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

³Badan Standarisasi Instrumen Pertanian, Kementerian Pertanian.

⁴Program Studi Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat.

⁵ Pusat Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada

^aKoresponden : Galang Indra Jaya; Email : galang@instiperjogja.ac.id

(Diterima: 20-07-2023; Ditelaah: 23-07-2023; Disetujui: 20-09-2023)

ABSTRACT

Phosphate solubilizing bacteria (PSB) are one of the microbes that play an important role in soil and plant cycles. Phosphate (P) is a very important macronutrient for plants. In soil, most of the P element is found to be unavailable to plants because it is fixed by Ca, Al or Fe. This research aims to identify BPF in acid soil which has the potential to dissolve phosphate elements. The method used in this research is the isolation of BPF from acid soil using the National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) medium, phosphate dissolution index test and UV Visual. Soils from overflow type C (TLC) swamps have higher diversity compared to TLB soils. The abundance of BPF in TLC soil was higher ($5,4 \cdot 10^7$ CFU per gram) compared to soil from overflow zone B (TLB) ($2,9 \cdot 10^7$ CFU per gram) because TLC soil had a lower acidity level than TLB. There were 55 BPF isolates obtained from these two types of soil. Two isolates (TLB1 and TLB2) had a better phosphate solubilization index and all potential isolates that were extracted and subjected to gDNA amplification showed a DNA band at 1330-1500 bp.

Keywords: Isolate, Phosphate Dissolution Index, Abundance, Amplification.

ABSTRAK

Bakteri pelarut fosfat (BPF) merupakan salah satu mikroba yang berperan penting dalam siklus tanah dan tanaman. Fosfat (P) merupakan makronutrien yang sangat penting bagi tanaman. Di dalam tanah unsur P sebagian besar ditemukan tidak tersedia bagi tanaman karena difiksasi oleh Ca, Al atau Fe. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi BPF pada tanah masam yang berpotensi melarutkan unsur fosfat. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi BPF dari tanah masam dengan media *National Botanical Research Institute's Phosphate* (NBRIP), Uji indeks pelarutan fosfat serta UV Visual. Tanah dari rawa tipe luapan C (TLC) memiliki keanekaragaman yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanah TLB. Kelimpahan BPF di tanah TLC lebih tinggi ($5,4 \cdot 10^7$ CFU per gram) dibandingkan dengan tanah dari tipe luapan B (TLB) ($2,9 \cdot 10^7$ CFU per gram) karena pada tanah TLC memiliki tingkat kemasaman yang lebih rendah dibandingkan TLB. Terdapat 55 isolat BPF yang diperoleh dari kedua jenis tanah tersebut. Dua isolat (TLB1 dan TLB2) memiliki indeks pelarutan fosfat lebih baik serta semua isolat potensial yang diekstraksi dan dilakukan amplifikasi gDNA menunjukkan pita DNA pada 1330-1500 bp.

Kata Kunci: Isolat, Indeks Pelarutan Fosfat, Kelimpahan, Amplifikasi.

PENDAHULUAN

Fosfor (P) merupakan makronutrien utama setelah Nitrogen. Fosfor selalu disebutkan setelah Nitrogen di hampir semua buku tentang kesuburan tanah atau pemupukan. Fungsi fosfor pada tumbuhan adalah untuk penyimpanan dan transfer energi (ADP dan ATP), namun jumlah unsur ini di dalam tanah sangat rendah hanya mencapai 0,0005-0,15% di permukaan tanah (Havlin et al., 2014). Menurut Kasno dkk., 2009 fosfat di alam dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis, yaitu mineral fosfat apatit, khususnya fluorin apatit $\{Ca_5(PO_4)_3F\}$, fosforit dan guano. Ketersediaan P dalam tanah ditentukan oleh bahan induk tanah dan faktor lain seperti reaksi tanah (pH), kadar oksida Al dan Fe pada tanah masam serta kadar Ca dan Mg pada tanah basa.

Provinsi Kalimantan Selatan merupakan daerah yang memiliki lahan rawa. Lahan rawa dikategorikan menjadi beberapa jenis, salah satunya adalah tanah sulfat masam (TSM) yang ditandai dengan adanya pirit. pH tanah yang mengandung pirit, jika dikeringkan akan turun drastis hingga di bawah 2. Kondisi ini menyebabkan peningkatan kelarutan Fe^{3+} , Al^{3+} dan Mn^{4+} (Rorison 1978). Oleh karena itu tanaman berpotensi mengalami defisiensi nutrisi (terutama P) dan keracunan oleh Fe^{3+} , Al^{3+} dan Mn^{4+} .

Mikroorganisme dalam tanah dapat menguntungkan atau merugikan. Mikroorganisme yang merugikan terutama bersifat patogen bagi tanaman, sedangkan mikroorganisme yang menguntungkan menjadi pengurai bahan organik yang masuk ke dalam sistem tanah dan memperbaiki siklus hara seperti C, P, dan S dalam sistem tanah-tanaman (Salam, 2012). Mikroorganisme yang melakukan siklus P di dalam tanah adalah kelompok Bakteri Pelarut Fosfat (BPF). Peran BPF dalam tanah adalah membantu melarutkan P yang umumnya dalam bentuk tidak larut, untuk dimanfaatkan oleh tanaman.

Mikroorganisme dalam tanah merupakan komponen penting dalam tanah karena mikroorganisme merupakan bagian dari

siklus biokimia, seperti kehidupan flora, fauna, dan mikroorganisme itu sendiri. Reaksi penting dalam siklus biokimia adalah mineralisasi dan imobilisasi unsur hara esensial yang dibutuhkan tanaman. Bakteri yang berperan dalam reaksi tersebut adalah BPF. Informasi tentang keanekaragaman BPF di dalam tanah sangat diperlukan karena dapat digunakan untuk merencanakan strategi pengembangan pengelolaan lahan untuk menjamin keberlanjutan dan produktivitas agroekosistem.

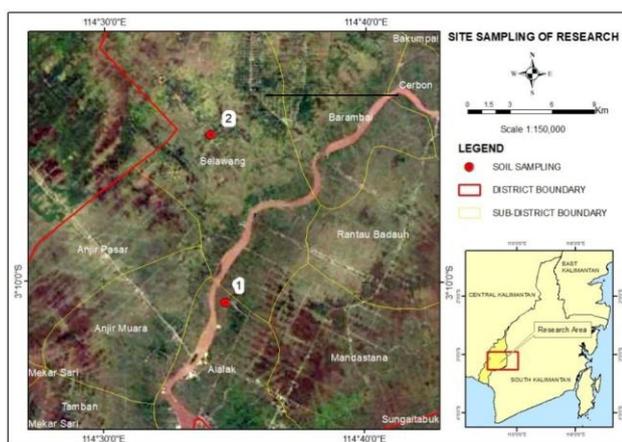
Penelitian mengenai karakterisasi BPF telah banyak dilakukan dan beberapa isolat telah ditemukan seperti *Azotobacter*, (Islamiati, 2015). *Bacillus* (Ulfiyati and Zulaika, 2015) *Pseudomonas* dan *Leclercia* (Teng, et al 2019). Isolat tersebut bersumber dari perairan dan tanah dengan karakter pH cenderung netral, sumber isolate yang diidentifikasi pada penelitian ini berasal dari tanah yang memiliki sifat kemasaman tinggi sehingga dapat memperkaya ilmu pengetahuan dan menjadi sedikit solusi pada masa mendatang terkait dengan permasalahan pemupukan terutama unsur fosfat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi serta karakterisasi BPF pada beberapa jenis tanah mineral masam serta menguji kemampuan BPF melarutkan fosfat secara kualitatif.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2019 – Mei 2019. Analisis dan Isolasi BPF di Laboratorium Klinik Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Data yang diperoleh dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik, tabel deskriptif, foto hasil penelitian serta foto sebagai bukti otentik.

Lokasi Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil di Provinsi Kalimantan Selatan, Kabupaten Barito Kuala seperti pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Lokasi Pengambilan Sampel Tanah untuk Diidentifikasi Bakteri Pelarut Fosfat.

Sampel tanah merujuk pada Gambar 1, pengambilan sampel tanah yang akan diisolasi BPF dari dua tempat berbeda yaitu di Desa Tanjung Harapan, Kecamatan Alalak (nomor 1) yang terdiri dari tanah dengan tipe luapan B (areal ini hanya tergenang pada pasang besar) TLB dan Desa Simpang Jaya, Kecamatan Belawang (nomor 2) dengan tipe luapan C (tidak tergenang tetapi kedalaman air tanah pada waktu pasang kurang dari 50 cm) berkode TLC.

Analisis pH Tanah

Analisis pH tanah dilakukan dengan pH meter. Sampel tanah yang digunakan sebanyak 5 gram dan akuades sebanyak 12,5 ml.

Isolasi BPF dari Dalam Tanah

Sampel tanah ditimbang sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam air dan ditambahkan 90 ml akuades hingga pengenceran 10^{-1} . 1 ml larutan dipipet dan ditambahkan 9 ml air suling menjadi pengenceran 10^{-2} . Ini diulang hingga 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} . Pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} ditumbuhkan pada media NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate*) yang terbuat dari 10 g, glukosa, 0,20 g l-1 KCl, 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,10 g $(NH_4)_2SO_4$ dan 15 g agar ditambahkan dengan unsur sumber P yaitu 5 g l-1 $Ca_3(PO_4)$, tiga ulangan (Nautiyal, 1999). Hasil inokulasi selanjutnya diinkubasi selama 7 hari hingga terlihat zona bening. Kemudian kepadatan BPF dihitung dengan rumus berikut.

$$C \times fp$$

Populasi BPF:

$$bk$$

Keterangan:

C = Jumlah Koloni

fp = Faktor Pengenceran

bk = Berat kering tanah

Observasi Morfologi Koloni Bakteri

Kultur murni bakteri ditumbuhkan pada media agar dengan metode penuangan dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu $25^\circ C$. Morfologi koloni bakteri yang terbentuk pada media diamati. Variabel meliputi bentuk, tepi, elevasi, keseluruhan dan warna koloni yang terbentuk. Uji pewarnaan gram BPF bertujuan untuk mengetahui reaksi gram bakteri. Kultur bakteri diambil satu ose lalu diratakan di atas kaca objek. Setetes KOH 3% diteteskan pada sampel dan kemudian dihomogenkan sampai koloni dan larutan menyatu.

Analisa Pelarutan Fosfat Secara Kualitatif

Kultur murni BPF potensial dari tanah diuji untuk mengetahui kemampuannya dalam melarutkan fosfat pada media NBRIP selama 7 hari sebanyak sembilan kali ulangan. Zona bening dan koloni yang terbentuk diukur setiap hari. Adanya zona bening menunjukkan kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat. *Solubilizing Index* (SI)/ indeks pelarutan fosfat, rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni bakteri, dihitung menggunakan rumus berikut: Indeks Pelarutan Fosfat: (Diameter koloni bakteri + Diameter zona bening)/ Diameter koloni bakteri (Karpagam & Nagalakshmi, 2014)

Ekstraksi DNA Bakteri & Amplifikasi

Metode yang digunakan dalam ekstraksi DNA mikroba tanah berdasarkan protokol yang dibuat oleh Geneaid. Satu perangkat Kit Bakteri gDNA Mini Presto™. Elektroforesis dengan cara menimbang Agarose 3% (0,30g) yang dimasukkan ke dalam gelas kaca dan ditambahkan TBE 1X 30 mL kemudian bahan dihomogenkan dan dipanaskan dengan

microwave selama 5 menit, setelah selesai dituangkan ke dalam piring kaca dan diberi sisir pencetak sumuran gel. Gel kemudian didiamkan ± 30 menit. Setelah gel memadat, pelat kaca dirangkai dengan rangkaian elektroforesis dan sisir dilepaskan. TBE 1X kemudian dituangkan ke dalam tangki mesin elektroforesis. Gel yang telah dicetak, sampel DNA target dimasukkan ke dalam lubang sisir, masing-masing 5 µl dan terakhir penanda 5 µl ditempatkan di tengah gel. Setelah itu dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis. Pastikan gel terendam dalam TBE 1X.

Running dilakukan pada 100 V selama 22 menit. Setelah *running*, gel dikeluarkan dari cetakan dan direndam dalam larutan etidium bromida selama 15 menit untuk pewarnaan. Kemudian gel dipindahkan ke injeksi air untuk dicuci. Selama proses pencucian, wadah air dikocok secara perlahan agar proses pencucian berlangsung. Pita DNA yang terbentuk pada gel diamati di bawah sinar UV menggunakan UV *Transilluminator*. Band target sekitar 1300-1500 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sifat tanah yang berbeda mempengaruhi kelimpahan BPF di dalam tanah. Tanah yang digunakan dalam objek penelitian memiliki nilai pH yang rendah (masam). Berdasarkan analisis pH tanah, kedua jenis tanah TLB dan TLC bersifat sangat masam yaitu 3,8 & 4,8, nilai yang lebih rendah tersebut dapat disebabkan karena keberadaan pirit yang dapat menyebabkan kemasaman tanah tinggi.

Kelimpahan Bakteri Pelarut Fosfat

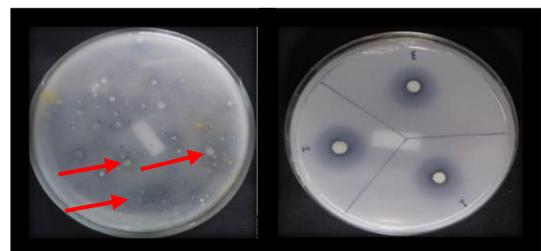
Permasalahan lahan rawa di beberapa daerah adalah adanya sumber keasaman yang tinggi yang menimbulkan hambatan seperti efek H⁺ yang menyebabkan luka pada tanaman (akar), terganggunya serapan unsur hara Ca, Mo, Mg dan P yang terserap oleh Al, defisiensi Ca, Mg, K dan kemungkinan Na, penurunan fiksasi siklus nitrogen, penurunan aktivitas mikoriza, peningkatan serangan patogen tular tanah dan akumulasi asam organik tanah atau unsur toksik yang tidak bermanfaat pada kondisi

oksidasi/reduksi. Metode yang digunakan dalam mengatasi permasalahan ini dapat menggunakan pupuk dolomit (Kusnadi et al. 2022) atau penanganan dapat secara alamiah dengan menggunakan BPF (Syahputra et al., 2018). Berikut ini merupakan hasil pengamatan mikroba.

Tabel 1. Kelimpahan jumlah Bakteri serta Golongan Bakteri Pelarut Fosfat dari Tanah Kalimantan Selatan.

Kode Jenis Tanah	Kelimpahan (Pengenceran 10 ⁸)	Jumlah BPF (CFU per g kering tanah*)
TLB	15	2.9 10 ⁷
TLC	40	5.4 10 ⁷

Hasil pengamatan kelimpahan bakteri ditampilkannya dalam Tabel 1., pada tabel tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kelimpahan BPF pada kedua jenis tanah tersebut. Tanah TLC memiliki jumlah BPF lebih tinggi dari tanah TLB masing-masing mencapai 5,4 10⁷ dan 2,9 10⁷ CFU per g tanah kering. Kelimpahan mikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah pH tanah, seperti yang disampaikan oleh Taha (1969) pada penelitiannya disebutkan bahwa pH tanah mempengaruhi pertumbuhan BPF, pH tanah yang optimum untuk pertumbuhan BPF pada pH netral. Tanah dengan kode TLC cenderung mendekati pH netral dibandingkan TLB sehingga kelimpahan BPF lebih tinggi.



Gambar 2. Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) di media NBRIP. A: Isolasi BPF dari tanah pada pengenceran 10⁸; B: Pengujian BPF isolate Tunggal.

Gambar 2. menunjukkan isolasi BPF dari tanah. Banyak bakteri yang tumbuh pada media NBRIP. Namun, hanya koloni bakteri yang membentuk zona bening pada media padat yang merupakan bakteri pelarut fosfat. Terdapat 55 isolat BPF yang diperoleh dari tanah, namun hanya 4 isolat terpilih yang diuji lebih lanjut yaitu dengan pertimbangan pembentuk zona bening terluas serta kemurnian bakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jaya et al. (2020) pada penelitian tersebut bakteri yang diidentifikasi dapat melarutkan fosfat

diindikasikan membentuk zona bening pada media NBRIP yang memiliki warna dasar putih.

Morfologi Koloni Bakteri

Pada Tabel 2. Kode isolate berupa TLB1 dan TLB2 merupakan isolat yang berasal dari lahan rawa dengan luapan tipe B, sedangkan TLC1 & TLC2 merupakan isolat yang diperoleh dari lahan rawa dengan luapan tipe C.

Tabel 2. Identifikasi Koloni Bakteri Pelarut Fosfat yang Telah Dimurnikan.

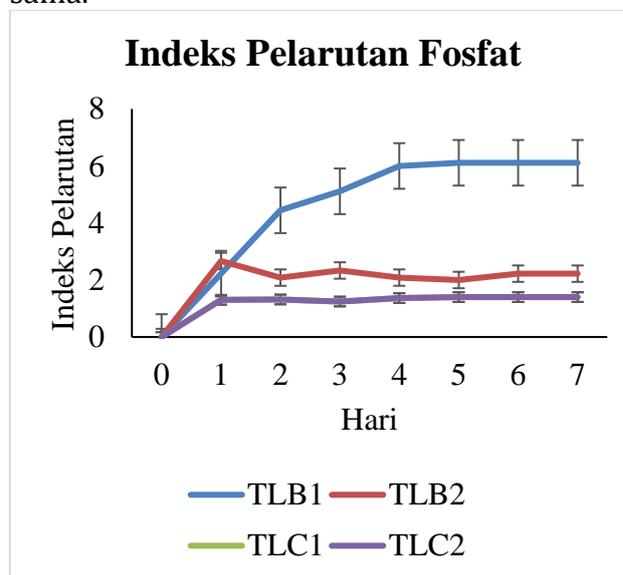
No	Nama Isolat	Morfologi koloni (Color, Elevation, Edge, Overall)	Gram
1	TLB1	Cream, Plateau, Smooth, Round	Negative
2	TLB2	Cream, Flat, Erode, Round	Negative
3	TLC1	Cream, Plateau, Erode, Round	Negative
4	TLC2	Cream, Flat, Erode, Irregular	Negative

Pada tabel ini dapat diketahui bahwa isolate TLB1 dan TLC 1 diduga masuk ke dalam famili yang sama, sedangkan TLB2 diduga memiliki famili yang sama dengan TLC2, hal tersebut di dasarkan pada kemiripan morfologi koloni bakteri serta perbedaan saat pewarnaan gram. Isolat TLB2 & TLC2 diduga merupakan famili dari golongan *bacillus* s.p didasarkan pada kemiripan morfologi serta pada pewarnaan gram (Puspita dkk., 2017). Isolat TLB1 & TLC1 memiliki kemiripan dengan *Burkholderia* spp, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ghosh et al, (2015) bakteri tersebut dapat melarutkan fosfat cukup baik pada media NBRIP.

Pelarutan Fosfat Secara Kualitatif

Identifikasi dilakukan hanya pada isolat yang menunjukkan kemampuan membentuk zona bening yang luas. Dua isolat BPF dari masing-masing jenis tanah diuji kemudian diidentifikasi. Hasil identifikasi menunjukkan adanya perbedaan morfologi koloni. Namun koloni yang diperoleh dari kedua jenis tanah

tersebut cenderung memiliki warna yang sama.



Gambar 3. Uji kualitatif kemampuan melarutkan fosfat pada media padat NBRIP. TLB1 dan TLB2 merupakan isolat yang berasal dari lahan rawa dengan luapan tipe B, sedangkan TLC1 & TLC2 merupakan isolat yang diperoleh dari lahan rawa dengan luapan tipe C. Bilah menunjukkan kesalahan standar pada tingkat kesalahan 5%.

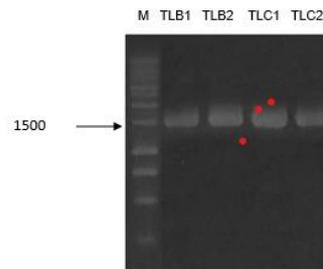
Isolat BPF yang telah teridentifikasi kemudian diuji secara kualitatif untuk mengetahui kemampuannya dalam melarutkan fosfat seperti pada Gambar 3. Indeks pelarutan fosfat adalah selisih antara diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter diameter koloni dibagi dengan diameter koloni. Berdasarkan gambar tersebut, isolat TLB1 secara nyata memiliki indeks pelarutan fosfat tertinggi diikuti oleh TLB2, TLC2 dan TLC1.

Gambar 3. menunjukkan uji kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat yang dilakukan pada media NBRIP. Masing-masing media padat diatur dengan ketebalan yang sama (10 ml/cawan Petri) untuk menghindari kesalahan saat pengamatan. Zona bening yang terbentuk pada media padat menunjukkan bahwa bakteri ini memiliki kemampuan melarutkan fosfat dalam air dengan mekanisme BPF dalam aktivitasnya menghasilkan asam-asam organik, antara lain asam sitrat, format dan glaukonik (Pande et al., 2017) Asam-asam tersebut terbukti mampu mengubah P yang tidak tersedia bagi tanaman di dalam tanah menjadi tersedia. P dalam tanah yang diikat oleh Al/Fe dapat menjadi ion dalam tanah karena Al/Fe menjadi Al/Fe-khelat dalam tanah oleh asam fosfatase. Asam fosfatase merupakan salah satu indikator yang dapat digunakan untuk melihat tingkat mineralisasi P dalam tanah (Suliasih & Rahmat, 2007). Unsur P penting bagi pertumbuhan tanaman, menurut penelitian yang dilakukan oleh Rahayu, (2017) menunjukkan bahwa perlakuan pupuk fosfat dapat mempengaruhi lebar daun, artinya dengan lebar daun yang lebih tinggi fotosintesis berjalan lebih baik sehingga produktivitas tanaman berpotensi meningkat.

Ekstraksi DNA Bakteri & Visualisasi

Visualisasi DNA menggunakan metode elektroforesis, yaitu cara untuk memisahkan molekul selular karena perbedaan ukurannya

yang dipengaruhi oleh medan listrik.



Gambar 4. Analisis Fragmen DNA; M: Marker 1 kb, TLB1 dan TLB2 merupakan isolat yang berasal dari lahan rawa dengan luapan tipe B, sedangkan TLC1 & TLC2 merupakan isolat yang diperoleh dari lahan rawa dengan luapan tipe C.

Hasil visualisasi pada gambar 4. menunjukkan bahwa dari keempat bakteri terpilih yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat yang diamplifikasi dengan primer 16sDNA (27f dan 1492r) pada kisaran 1.380-1.500 bp, berarti keenam bakteri tersebut memiliki sekitar 1.380-1.500 pasangan basa. Pasangan basa menggambarkan fragmen DNA. Menurut penelitian yang dilakukan oleh (Hakovirta et al., 2016) bahwa DNA *Bacillus* diamplifikasi pada kisaran 1500 bp, selain itu (Mursyida, 2015) terungkap bahwa *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* & *Burkholderia cepacia* juga diamplifikasi pada kisaran 1.500 bp. Bakteri tersebut masuk ke dalam BPF serta PGPR yang sering digunakan sebagai agen kelarutan fosfat untuk mendukung pertumbuhan tanaman.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan kelimpahan BPF pada jenis tanah yang diamati pada penelitian ini. Kelimpahan BPF pada tanah TLC lebih tinggi dibandingkan tanah TLB, yaitu masing-masing $5,4 \cdot 10^7$ dan $2,9 \cdot 10^7$ CFU per g tanah kering. Terdapat 55 isolat BPF yang diperoleh dari kedua jenis tanah tersebut dan dua isolat (TLB1 dan TLB2) berpotensi digunakan sebagai pupuk hayati untuk meningkatkan kelestarian dan produktivitas lahan. Semua isolat yang diekstraksi dari DNA dan diekstraksi dari amplifikasi gDNA

menunjukkan 1330-1500 bp. Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk mengidentifikasi isolat sampai tahap molekuler, menguji kemampuan isolat melarutkan fosfat secara kuantitatif, dan mengkaji pengaruh isolat terhadap pertumbuhan jagung.

DAFTAR PUSTAKA

- Ghosh, R, Soma Barman S, Mukherjee, R , Narayan, Mandal, 2016.Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal,India.. <https://doi.org/10.1016/j.micres.Microbiological Research.2017.09.008>
- Hakovirta, R. J, Prezioso, S., Hodge, D., Pillai, S. P., & Weigel, L. M. 2016.Identification and Analysis of Informative Single Nucleotide Polymorphisms in 16S rRNA Gene Sequences of the *Bacillus cereus* Group. *J. Clin. Microbiol* 54, 2749–2756 doi: 10.1128/JCM.01267-16.
- Havlin, John., Samuel L Tisdale, Werner L Nelson, and James D Beaton. 2014.*Soil Fertility and Fertilizer*. Edition, 8. New Jersey, USA: Pearson inc
- Islamiati , A. 2015. Potensi *Azotobacter* Sebagai Pelarut Fosfat. *J. Sains Dan Seni Pomits*, 2 2–4.
- Joe, M., Deivaraj, S., Benson, A., Henry, J., And, & Narendrakumar, G.2018. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Agri Nat Res*, 52, 305–308.doi: 10.1016/j.anres.2018.09.014
- Jaya, G. I., S. N. H. Utami, J. Widada, and W. A. Yusuf. 2020. “Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria Isolated from Acidic Ultisol Soil, South Borneo.” *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 449(1). doi: 10.1088/1755-1315/449/1/012005.
- Karpagam, T and Nagalakshmi, P.K. 2014 , “Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Agricultural Soil,” *I J Cur Microbiol and Appl Scie*, 3 601-614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>
- Kasno, A, Rochayati, S, dan Prasetyo. B. H. 2009 .Deposit, Penyebaran Dan Karakteristik Fosfat Alam. in: Fosfat Alam Pemanfaatan Pupuk Fosfat Alam Sebagai Sumber Pupuk P. Balai penelitian Tanah. 1-21
- Kusnadi, H., Desayati, Fauzi, E., Ishak, A., Firizon, J., & Wawan Eka Putra. (2022). Produktivitas Padi Di Lahan Rawa Dengan Kapur Dolomit. *Jurnal Pertanian*, 13(2), 47–53. <https://doi.org/10.30997/jp.v13i2.5548>
- Mursyida. E, Mubarik, N. R., & Tjahjoleksono, A. 2015. Selection and Identification of Phosphate-Potassium Solubilizing Bacteria from the Area Around the Limestone Mining in Cirebon Quarry. *Res. J. Microbiol* 10, 270–279. DOI: 10.3923/jm.2015.270.279
- Nautiyal, C Shekhar.1999.An Effcient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms C. *FEMS Microbiol Lett* 170, 265–70.doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x
- Pande.,A, Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. 2017.Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *IJGEB*, 15, 379–391. doi: /10.1016/j.jgeb.2017.06.005
- Puspita, F, Ali, M., Pratama, R.2017. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri *Bacillus* sp. Endofitik dari Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agrotek Tropika*.<https://jatt.ejournal.unri.ac.id/index.php/JATT/article/view/6219>.
- Rahayu, A, Setyono, dan S Susanto (2017). Pengaturan Keragaan Tanaman Pamelo (Citrus

- Maxima (Burm.) Merr.) Dengan Pemangkasan Dan Kombinasi Pupuk N, P, Dan K Plant Performance Setting Of Pummelo (Citrus Maxima (Burm.) Merr.) Through Pruning And Combining of N, P, And K Fertilizer. Jurnal Pertanian, 7(1), 7-13. <https://doi.org/10.30997/Jp.V7i1.31>.
- Rorison, H.I. 1973. The Effect Of Extreme Soil Acidity On The Nutrient Uptake And Physiology Of Plants. Nat Cons Gras Res Un, 1(582), 223-254. <https://doi.org/10.1038/023178a0>
- Salam, A.K. 2012 .Ilmu Tanah Fundamental. Global Madani Press. Lampung. 362 hlm
- Suliasih dan Rahmat. 2007. Aktivitas Fosfatase Dan Pelarutan Kalsium Fosfat Oleh Beberapa Bakteri Pelarut Fosfat. Biod. 8.23-26. doi: 10.13057/biodiv/d080105
- Syahputra, R., Hanafiah, A. S., & Tengku Sabrina. (1970). Pengaruh Pemberian Azolla dan Bakteri Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Padi Sawah (Oryza sativa L.) Di Tanah Sulfat Masam. Jurnal Pertanian Tropik, 5(2), 301-308. <https://doi.org/10.32734/jpt.v5i2.3024>
- Taha, S. M., and S. A.Z. Mahmoud, A.H.El-Damaty, A.M. Abd. El-Hafez. 1969. Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian Soils. Plant Soil 31(1): 149-160. <https://doi.org/10.1007/BF01373034>
- Teng, Z, Shao, W., Zhang, K., Huo, Y., & Li, M. 2019. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. J Environ Manage, 231, 189-197. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.10.012.
- Ulfiyati, N and Zulaika, E. 2015. Isolat *Bacillus* Pelarut Fosfat Dari Kalimas Surabaya. J. Sains dan Seni Pomits ITS 4, 6-8. DOI: 10.12962/j23373520.v4i2.14049