

JRL	Vol.6	No.3	Hal. 303 - 308	Jakarta, November 2010	ISSN : 2085-3866
-----	-------	------	----------------	---------------------------	------------------

KEBERADAAN BAKTERI PELARUT FOSFAT DAN AKTIVITAS ENZIM FOSFATASE TANAH DAERAH PERAKARAN TANAMAN OBAT DARI KEBUN RAYA CIBODAS

Suliasih

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
E-mail Lishadari@yahoo.co.id

Abstract

A study was undertaken to investigate to occurrence of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil samples of medicine plants in Cibodas Botanical Garden. 13 soil samples of medicine plants are collected randomly The result shows that 71 isolates of phosphate solubilizing bacteria were isolated, and 10 species of these organism was identified as Azotobacter sp, Bacillus sp, Chromobacterium sp, C.violaceum, Citrobacter sp. , Enterobacter sp., E. liquefaciens. Nitrosomonas sp., Serratia rubidaea, Sphaerotillus natans. Azotobacter sp. And Bacillus sp. Are found in all of soil tested. Conversely, Serratia rubidaea is only in the sample from rhizosphere of Plantago mayor The activity of acid alkaline phosphatase in soil tested ranged from 0.78 – 60,18 ugp nitrophenole/g/h, with the highest values being recorded in soil sample from rhizosphere of "Lavender".

Keywords : *phosphate solubilizing bacteria, soil enzyme phosphatase*

1. Pendahuluan

Tanah sangat kaya akan keragaman mikroba seperti bakteri, aktinomisetes, fungi, protozoa, alga dan virus. Mikroba mempunyai peran penting dalam kesuburan tanah. Tanah yang subur mengandung 100 juta mikroba per gram tanah. Produktivitas dan daya dukung tanah tergantung pada aktivitas mikroba tersebut. Mikroba tanah berperan penting dalam rantai makanan dan merupakan bagian penting dalam siklus geokimia seperti siklus karbon, nitrogen, sulfur dan fosfor⁷ (Banig,et,al, 2008) Lingkungan tanah disekitar perakaran tanaman merupakan zona tempat aktivitas

mikroba.

Salah satu kelompok mikroba adalah bakteri pelarut fosfat (BPF), seperti Pseudomonas, Bacillus, Eschericia, Actinomycetes, terdapat di dalam tanah dan memainkan peranan penting dalam mensuplai P pada tanaman (Gyaneshwar, et,al, 2002). BPF berperan dalam melarutkan fosfat organik dan anorganik menjadi fosfat yang terlarut dan tersedia bagi tanaman (Richardson, et,al,2001). Sekitar sepersepuluh sampai setengah jumlah bakteri yang diisolasi dari tanah mampu melarutkan fosfat, jumlah bakteri tersebut

berkisar 105 – 107/gr tanah dan banyak dijumpai di daerah perakaran tanaman.

Dalam tanah dijumpai fosfor organik dan anorganik, keduanya merupakan sumber penting bagi tanaman. Ketersediaan P dalam tanah pada umumnya rendah. Hal ini disebabkan P terikat menjadi Fe-fosfat dan Al-fosfat pada tanah masam atau $\text{Ca}^3(\text{PO}_4)_2$ pada tanah basa. Tanaman tidak dapat menyerap P dalam bentuk terikat dan harus diubah menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman. Mikroba tanah berperan dalam beberapa aktivitas dalam tanah seperti pelarutan P terikat oleh sekresi asam dan mineralisasi komponen fosfat organik dengan mengubahnya menjadi bentuk anorganik (Cunningham, et,al, 1992)..

Mineralisasi fosfat organik melibatkan peran mikroba tanah melalui produksi enzim fosfatase seperti fosfatase asam dan basa. Beberapa enzim fosfatase seperti fosfomonoesterase, fosfodiesterase, trifosfomonoesterase dan fosfoamidase pada umumnya terdapat didalam tanah. Enzim tersebut yang bertanggung jawab pada proses hidrolisis P organik menjadi fosfat anorganik (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) yang tersedia bagi tanaman.(Pang and H.Kolenk, et,al,1986., Mearyard,et,al,1999., Lal, et,al, 2002.)

Penelitian enzim fosfatase tanah daerah perakaran tanaman obat belum banyak dilakukan. Dengan demikian pengamatan ini bertujuan untuk mengungkapkan keberadaan BPF pada daerah perakaran tanaman obat di Kebun Raya Cibodas, dalam rangka mencari bakteri yang potensial sebagai pupuk hayati pertanian.

2. Bahan dan Metode

2.1. Pengambilan Sampel Tanah

Tanah dikoleksi dari daerah perakaran tanaman obat Kebun Raya Cibodas. Tanah diambil dari 5 titik dari tiap-tiap jenis tanaman secara acak

dari kedalaman 0 – 15cm, kemudian dicampur. Campuran tanah dikering anginkan dan digerus kemudian diayak dengan diameter 2mm.

2.2 Perhitungan dan Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari tanah

Penghitungan bakteri total dan bakteri pelarut fosfat menggunakan metoda "*plate count*". Sepuluh gram tanah yang telah dikering anginkan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml berisi 90 ml aquades steril, kemudian di gojlok selama 1 jam pada shaker dengan kecepatan 120 rpm (sampai homogen). Dibuat satu seri pengenceran 10-1 – 10-7 dari ekstrak tanah dan masing-masing pengenceran diambil 0,2 ml dengan pipet steril dan dituangkan kedalam cawan petri steril, kemudian kedalamnya dituangkan media agar pikovskaya (untuk Bakteri pelarut fosfat) yang terdiri dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 gr, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 gr; NaCl 0,2 gr; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gr; KCl 0,2 gr; Glukosa 10 gr; ekstrak ragi 0,5 gr; agar 20 gr; MnSO_4 dan FeSO_4 sedikit, akuades 1000 ml³. Isolasi total bakteri tanah digunakan media NA. Biakan yang ditanam pada cawan petri yang telah yang telah memadat disimpan secara terbalik dalam inkubator dengan suhu sekitar 30°C. Setelah tiga sampai tujuh hari pertumbuhan diamati setiap hari. Bakteri pelarut fosfat akan ditunjukkan dengan terbentuknya koloni yang dikelilingi daerah bening (*holozone*). Kemudian koloni tersebut dimurnikan dan dipindahkan ke tabung reaksi agar miring berisi media pikovskaya. Dan disimpan untuk penelitian selanjutnya.

2.3 Pengukuran Aktivitas Enzim Fosfomonoesterase (PME-ase)

Pengukuran aktivitas enzim fosfatase dari tanah dilakukan dengan menggunakan p-nitrofenol fosfat sebagai substrat (Tabatabai,et,al, 1969). Sebanyak 1gram sampel tanah ditambahkan dengan 1 ml substrat p-NPP fosfat 115 Mn dan 4 ml

buffer asetat pH 6,5 (untuk fosfatase asam) atau pH 7,5 (untuk fosfatase basa) dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 38°C. Pada hasil inkubasi ditambahkan 1 ml CaCl₂ 0,5M lalu dikocok. Kontrol dibuat dengan prosedur yang sama pada sampel, tetapi penambahan 1 ml larutan substrat dilakukan setelah penambahan 1 ml CaCl₂ 0,5M. Sampel dan kontrol diukur absorbannya pada panjang gelombang 400 nm. Standar dan blanko mendapat perlakuan yang sama seperti sampel. Standar menggunakan larutan p-nitrofenol dengan konsentrasi 1-6 ppm, sedangkan untuk blanko menggunakan air destilasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi dan identifikasi dari 13 sampel tanah daerah perakaran tanaman obat dapat dikoleksi 71 isolat yang mampu membentuk daerah bening (holozon) disekeliling koloni. Setelah identifikasi didapat 10 jenis Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) yaitu *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Chromobacterium sp.*, *C. violaceum*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. liquefaciens*, *Nitrosomonas sp.*, *Serratia rubidaea*, *Sphaerotillus natans* (Tabel 1).

Keberadaan BPF pada tiap tanah didominasi oleh *Azotobacter sp.*, *Nitrosomonas sp.* dan *Bacillus sp.* *Azotobacter sp.* dan *Bacillus sp.* terdapat pada semua tanah daerah perakaran tanaman obat yang diamati. Demikian juga *Nitrosomonas sp.* terdapat pada hampir semua jenis tanah kecuali pada daerah perakaran tanaman *Orthosiphon sp.* *Citrobacter sp.* dan *Sphaerotillus natans* masing-masing terdapat pada 9 dan 7 sampel tanah. *Chromobacterium sp.* dan *C. violaceum* masing-masing terlihat pada 6 tanah daerah perakaran tanaman yang berbeda. Sedangkan *Enterobacter sp.*, *E. liquefaciens* keberadaannya masing-masing hanya terlihat pada 3 dan 2 sampel tanah, demikian juga dengan *Serratia rubidaea* hanya terdapat pada tanah daerah perakaran

Plantago major saja (Tabel 2). *Azotobacter sp.* merupakan bakteri aerobik penambat nitrogen, selain itu juga mempunyai kemampuan untuk melarutkan fosfat organik dan mineral fosfat. Beberapa bakteri yang berasosiasi dengan tanaman dipunyai oleh genus *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* dan *Serratia*, mempunyai pengaruh yang menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman. Bakteri yang paling efisien adalah genus *Bacillus* dan *Pseudomonas* banyak ditemukan di daerah perakaran legume, padi, jagung, oat, jute, cabe. *Serratia sp.* merupakan BPF yang banyak ditemukan di dalam tanah. Menurut Rodriguez. H., et.al, 1999 dari beberapa strain bakteri ternyata *Bacillus* dan *Pseudomonas* mempunyai kemampuan yang tinggi dalam melarutkan fosfat. Sedangkan Rodriguez. H., et.al, 1999, dan Mikanova, et.al, 2002 mendapatkan bahwa bakteri penambat nitrogen lainnya seperti strain dari genus *rhizobium* mempunyai kemampuan dalam melarutkan fosfat.

Adanya variasi bakteri dalam tanah tersebut kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor yang ada dalam tanah seperti hara tanah, pH, kelembaban, kandungan bahan organik dan beberapa aktivitas enzim tanah. Keberadaan mikroba dalam tanah tergantung dari faktor kimia tanah, fisik tanah, vegetasi, rotasi tanaman dan kondisi lingkungan. Tanaman memainkan peranan penting dalam menyeleksi dan memperkaya jenis-jenis bakteri oleh karena eksudat akar yang dikeluarkannya. Ketersediaan bahan makanan (sumber C), baik dalam bentuk organik maupun anorganik sangat menentukan tingkat populasi, keragaman dan aktivitas mikroba. Selain itu komposisi dan aktivitas mikroba tanah dipengaruhi oleh lingkungan mikro tanah yaitu lingkungan fisik, kimia, dan biologi tanah dimana mikroba tersebut berada pada waktu tertentu. Mikroba tanah tumbuh paling banyak dipermukaan partikel tanah terutama

Tabel 1. Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat dari Daerah perakaran tanaman obat Kebun Raya Cibodas

No.	Tanaman obat	Bakteri Pelarut Fosfat
1	<i>Alpinia galangal</i> Wild.	<i>Enterobacter liquefaciens</i> , <i>Chromobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.,
2	"Lavender"	<i>Chromobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,
3	<i>Centela Asiatica</i> Urban.	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,
4	<i>Plantago mayor</i> Bert.ex Bam	<i>Serratia rubidaea</i> , <i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Chromobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,
5	<i>Graptophyllum pictum</i> Griff.	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Chromobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,
6	<i>Jatropha multifida</i> Linn.	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Sphaerotillus natans</i> <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.
7	<i>Mentha arvensis</i> Linn. <i>Hortex</i> C. Koch	<i>Chromobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.
8	<i>Cana edulis</i> Ker. Gawl	<i>Enterobacter liquefaciens</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.
9	<i>Orthosiphon</i> sp.	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,
10	<i>Sida cordifolia</i> Forsk	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,
11	<i>Sauropus androgynus</i> Merrill	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.
12	<i>Balsamina balsamina</i> Huth.	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Chromobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.
13	<i>Berberis nepaluensis</i>	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp.,

di daerah rizosfer. Lingkungan fisik dan kimia tanah dapat berpengaruh langsung terhadap jenis dan jumlah mikroba. Mikroba umumnya tumbuh di permukaan partikel, sebagian tumbuh dan berkembang di dalam larutan tanah. Senyawa organik dan anorganik yang dilepaskan sel akar akan mempengaruhi lingkungan kimia di dalam tanah dan secara tidak langsung mempengaruhi kehidupan

mikroba. Akar tanaman secara selektif menyerap dan mentransport ion-ion sehingga merubah komposisi kimia larutan tanah (Ponmurugan, et,al, 2006., Taha, et,al, 1969).

Tabel 3 menunjukkan hasil populasi total bakteri, populasi bakteri pelarut fosfat dan aktivitas enzim fosfatase tanah daerah perakaran tanaman obat. Populasi total bakteri

Tabel 2. Keberadaan Bakteri Pelarut Fosfat pada daerah perakaran tanaman obat Kebun Raya Cibodas

Bakteri Pelarut Fosfat	Tanaman Obat												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Azotobacter sp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus sp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chromobacterium sp.</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Citrobacter sp</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nitrosomonas sp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Sphaerotillus natans</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Serratia rubidaea</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 3 . Populasi Bakteri Pelarut Fosfat dan aktivitas enzim fosfatase pada daerah perakaran tanaman obat Kebun Raya Cibodas

No.	Tanaman obat	Populasi Bakteri (10 ⁵)		Aktivitas enzim fosfatase tanah (ug/p nitrophenol/g/jam)	
		Total	BPF	Asam	Basa
1	<i>Alpinia galangal Wild.</i>	5 h	1,5 fgh	22,86 j	7,15 h
2	"Lavender"	40 h	10 d	60,18 a	20,16 a
3	<i>Centella Asiatica Urban.</i>	5 h	0,4 h	54,68 e	10,35 f
4	<i>Plantago mayor Bert.ex Bam</i>	6 h	3,1 ef	12,06 n	9,7 g
5	<i>Graptophyllum pictum Griff.</i>	155 f	2,9 ef	55,07 d	10,07 fg
6	<i>Jatropha multifida Linn.</i>	100 g	4,2 e	52,96 f	12,46 e
7	<i>Mentha arvensis Linn.HortexC.Koch</i>	450 d	0,95 h	16,19 l	0,78 j
8	<i>Cana edulis Ker. Gawl</i>	1525 a	1,1 h	24,33 i	10,07 fg
9	<i>Orthosiphon sp.</i>	1550 a	1,3 gh	37,56 h	16,71 d
10	<i>Sida cordifolia Forsk</i>	1350 b	15 c	58,66 b	17,95 c
11	<i>Sauropus androgynus Merrill</i>	475 d	1,3 gh	12,07 m	9,7 g
12	<i>Balsamina balsamina Huth.</i>	720 c	25 a	18,3 k	4,41 i
13	<i>Berberis nepaluensis</i>	230 e	0,2 h	57,93 c	19,18 b

Keterangan; huruf yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan ($p < 0,05$)

bervariasi antara 5 10⁵ – 1550 10⁵ sel per gram tanah dan BPF sekitar 0,2 10⁵- 25 10⁵ sel per gram tanah atau sekitar 0,1% - 50% dibandingkan populasi total bakteri. Populasi bakteri tertinggi didapat pada daerah perakaran

Orthosiphon sp. Populasi tertinggi untuk BPF terjadi pada tanaman *Balsamina balsamina* atau sekitar 3,5% dari total bakteri pada tanaman yang sama. Bakteri pelarut fosfat ditemukan pada semua tanah yang diamati.

Populasi BPF dalam tanah kadang-kadang sangat rendah kurang dari 102 sel/gram tanah sampai 106 6. Aktivitas enzim fosfatase asam dan basa masing-masing berkisar antara 12,06 – 60,18 ug p nitrofenol/g/jam dan 0,78 – 20,16 ug p nitrofenol/g/jam.

Aktivitas enzim asam maupun basa tertinggi didapat pada tanah daerah perakaran tanaman “Lavender”. Dari hasil percobaan ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim tanah tidak dipengaruhi oleh jumlah populasi BPF, tapi lebih dipengaruhi oleh jenis tanaman. Hal yang sama terjadi pada percobaan 11 yang menunjukkan bahwa aktivitas enzim fosfatase pada tanah dipengaruhi oleh jenis vegetasi yang tumbuh di atasnya. Hal ini karena akar tanaman, dekomposisi serasah, mikroba dan fauna merupakan sumber utama enzim fosfatase tanah.

4. Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim fosfatase pada tanah dipengaruhi oleh jenis vegetasi yang tumbuh di atasnya.

Dari 13 tanah daerah perakaran tanaman obat didapat 71 isolat Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dan diidentifikasi menjadi 10 jenis BPF yang didominasi oleh bakteri *Azotobacter* sp dan *Bacillus* sp.. Bakteri *Azotobacter* selain dapat melarutkan fosfat sukar larut juga dikenal sebagai bakteri penambat nitrogen. Isolat BPF yang didapat merupakan isolat berpotensi yang dapat digunakan sebagai pupuk hayati yang ramah lingkungan, sehingga dapat mengurangi penggunaan pupuk kimia. Untuk mengetahui potensi dari isolat bakteri yang didapat perlu dilakukan uji kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat sukar larut skala laboratorium maupun lapangan.

Daftar Pustaka

1. Banig A.E., Aly E.A., Khaled A.A. and Amel K.A., 2008. *Isolation, characterization and application of*

bacterial population From agricultural soil at Sohag Province, Egypt. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 4 (2) 2008, pp 42-50.

2. Cunningham, J.E., and C. Kuyack. 1992. *Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1451-1458
3. Gaur, A.C., 1981. *Phospho-microorganism and various transformation In Compost Technology*, Project Field Document No. 13 FAO. P.106-111
4. Gyaneshwar.P., G.N.Kumar , L.J. Parekh and P.S. Poole. 2002. *Role of soil microorganism in improving P nutrition of Plants*. *Plant soil* 245: 83-93.
5. Illmer, P. & F. Schinner. 1995. *Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms*. *Soil Biology Biochemistry* 27:257-263.
6. Kucey, R.M.N., 1983. *Phosphate-solubilizing Bacteria and Fungi in various cultivated and virgin Alberta soils*. *Can. J. Soil Sci.* 63:671-678
7. Kummerer, 2004. *Resistance in the environment*. *J Antimicrob Chemoth* 45: 311-320.
8. Lal.L., 2002. *Phosphate biofertilizers*. *Agrotech. Publ. Academy*, Udaipur. India. 224p.
9. Mearyard.B., 1999. *Phosphate enzymes from plants*. *Journal of Biological Education*, 33(2): 109-112.
10. Mikanova, O. and J. Novakova. 2002. *Evaluation of the P solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate*. *Rostlinna Vyroba*, 48 (9): 397-400.
11. Pang.P.C.K. and H. Kolenk. 1986. *Phosphomonoesterase activity in forest soils*. *Soil Biol. Biochem.* 18 (1): 35-40.
12. Ponmurugan.P., and C. Gopi. 2006. *In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria*. *African Journal of Biotechnology* 5(4):348-350.

13. Richardson.A.E., 2001. *Prospect for using soil microorganisms to improve the a quisition of phosphorus by plants.* Aust. J. Plant Physiol. 58: 797-906.
14. Rodriguez.H., and R. Fraga. 1999. *Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotiont.* Biotech. Adv. 17:319-339.
15. Subba Rao, N.S., 1982. *Biofertilizer in Agricultural.* Oxford and IBH Publishing Co.
16. Subba Rao, N.S., 1982. Mikroorganisma tanah dan pertumbuhan tanaman. Edisi ke-2 Penerbit UI.
17. Tabatabai.M.A. and J.M. Bremner. 1969. *Use of P-nitrophenyl Phosphate Assay of Soil Phosphatase Activity.* Soil. Biol. Biochem. 1: 301-307.
18. Taha, S.M., S.A.Z. Mahmoud, A. Halim El Damaty and A.M. Abd. El. Hafez. 1969. Activity of phosphate dissolcing bacteria in egyption soils. Plant and Soil XXXI, No.1.