

AKTIVITAS FITOHORMON INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) DARI BEBERAPA ISOLAT BAKTERI RIZOSFER DAN ENDOFIT

R. Bambang Sukmadi

Balai Pengkajian Bioteknologi, Deputi Bidang TAB - BPPT
Kawasan PUSPIPTEK Gedung 630 Serpong, Tangerang Selatan. 15314
E-mail: bambang.sukmadi@bppt.go.id; rbsukmadi@yahoo.com

Abstract

A total of 34 isolates of rhizosphere bacteria and endophytic bacteria have been isolated from several fruit and vegetable plants. Bacterial isolates were then screened to produce phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) in a minimal medium (MM) with the addition of 1 g/l tryptophan as a precursor. Phytohormone production was carried out in an incubator shaker for 5 days at 28°C in a dark condition. IAA in the culture supernatant was extracted with ethyl acetate. The presence of IAA in the bacterial extract was detected using Thin Layer Chromatography (TLC). The concentration of IAA was determined quantitatively using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The result showed that among 34 bacterial isolates, 20 isolates were able to produce IAA with different concentrations. The highest concentration of IAA (16,71 ppm) was produced by the endophytic bacteria isolated from twigs of starfruit plant. In addition, within the group of rhizosphere bacterial isolates, bacteria from kangkung plant was found to be the best one with IAA concentration of 10.99 ppm.

Kata kunci: bakteri rizosfer, bakteri endofit, TLC, HPLC, Indole-3-acetic acid (IAA).

1. PENDAHULUAN

Fitohormon (hormon tumbuh tanaman) sangat penting untuk membantu mempercepat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Fitohormon (*phytohormone*) berasal dari bahasa Yunani yaitu "phytoes" yang artinya tanaman dan "hormaein" yang artinya zat perangsang. Jadi fitohormon dapat didefinisikan sebagai zat-zat yang dapat merangsang pertumbuhan dan mengatur proses fisiologi tanaman. Menurut Teale *et al.* (2006) fitohormon dapat dibagi menjadi 6 kelompok yaitu auksin, sitokinin, etilen, giberelin, brasinosteroid dan asam absisat. Fitohormon auksin berfungsi merangsang pertumbuhan akar, mengatur pembesaran sel dan memicu pemanjangan sel tanaman, serta meningkatkan dominansi apikal dan diferensiasi xylem. Auksin banyak ditemukan pada embrio benih dan jaringan meristematik yang aktif tumbuh seperti tunas tanaman, ujung akar dan pucuk ranting/daun.

Menurut Tsavkelova *et al.* (2005) fitohormon auksin yang banyak terdapat di alam dan paling aktif adalah *Indole-3-Acetic Acid* (IAA). IAA adalah auksin utama pada tanaman dan terdapat pada hampir semua jenis tanaman (Leveau dan Lindow, 2005). Fitohormon auksin alami jenis IAA bersifat

sangat labil dan mudah terdegradasi secara enzimatis karena pengaruh aktivitas peroksidase pada tanaman. Selain itu, IAA juga mudah terdegradasi secara non-enzimatis akibat pengaruh intensitas cahaya dan temperatur yang tinggi. Oleh karena itu, larutan stok IAA sebaiknya disimpan pada botol berwarna coklat/gelap agar terlindung dari intensitas cahaya yang tinggi dan ditempatkan dalam pendingin dengan suhu 2 - 6°C (Dascaluc, 2002).

Selain auksin alami, juga terdapat auksin sintetik seperti *Naphthalene-3-Acetic Acid* (NAA), *2,4-Dichloropenoxyacetic acid* (2,4-D) dan *Indole-3-Butyric Acid* (IBA). Auksin sintetik jenis NAA lebih stabil daripada IAA terhadap temperatur dan intensitas cahaya yang tinggi. Namun, NAA kurang efektif dalam merangsang pertumbuhan akar dibandingkan jenis auksin yang lain. Auksin sintetik jenis 2,4-D bersifat sangat stabil terhadap temperatur dan intensitas cahaya yang tinggi.

Secara alamiah tanaman dapat mensintesis sendiri fitohormon auksin untuk pertumbuhannya. Selain itu, tanaman juga dapat memperoleh fitohormon auksin dari mikroba yang bersimbiosis dengan tanaman tersebut. Mikroba-mikroba tersebut biasanya hidup di daerah rizosfer dan endofit tanaman. Sehubungan dengan hal

tersebut, untuk mendapatkan mikroba penghasil fitohormon yang unggul biasanya dilakukan isolasi dan seleksi mikroba rizosfer dan mikroba endofit.

Rizosfer adalah tanah disekitar akar tanaman yang secara langsung dipengaruhi oleh mikroba tanah dan eksudasi perakaran tanaman. Penyediaan nutrisi pada tanaman sangat dipengaruhi oleh komposisi mikroba di daerah rizosfer. Menurut Akbari *et al.* (2007) beberapa mikroba rizosfer seperti *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, dan *Enterobacter sp*, dapat memberikan efek menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman. Tanaman menarik mikroba menguntungkan di daerah rizosfer dengan cara mengeluarkan eksudat akar yang berperan sebagai sumber nutrisi bagi mikroba. Sedangkan mikroba mengeluarkan metabolit berupa senyawa-senyawa aktif (salah satunya fitohormon) yang digunakan oleh tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Adanya eksudat akar tersebut yang menyebabkan populasi mikroba di daerah rizosfer jauh lebih tinggi daripada di tanah biasa.

Mikroba endofit merupakan mikroba yang seluruh siklus hidupnya berada dalam jaringan tanaman. Jenisnya dapat berupa bakteri, jamur, yeast dan actinomycetes. Mikroba masuk ke dalam jaringan tanaman dengan bermacam-macam cara, seperti melalui luka pada jaringan tanaman, stomata daun, maupun melalui pori-pori akar. Menurut Kutschera (2007) bakteri dapat masuk ke dalam jaringan daun tanaman bunga matahari melalui stomatum dan akhirnya hidup sebagai bakteri endofit. Sejumlah mikroba endofit diketahui secara nyata dapat memproduksi fitohormon terutama auksin jenis IAA. Tanaman inang yang ditumbuhi mikroba endofit mempunyai banyak keuntungan, seperti mempercepat pertumbuhan, meningkatkan daya tahan terhadap kekeringan dan serangan hama. Tugas tanaman inang hanyalah menyediakan kebutuhan nutrisi bagi mikroba endofitnya. Kondisi tanaman inang, keadaan tanah, suhu dan kelembaban sangat berpengaruh terhadap jumlah dan jenis mikroba endofit. Keberadaan mikroba endofit pada tanaman membantu tanaman berkompetisi di alam.

Keunggulan penggunaan produk mikroba penghasil auksin adalah secara alamiah mikroba tersebut tidak hanya menghasilkan auksin, tetapi mempunyai kemampuan untuk menghasilkan fitohormon yang lain. Bahkan beberapa isolat bakteri dapat bersifat multiguna, artinya selain sebagai penghasil fitohormon juga berperan sebagai pelarut fosfat, penambat nitrogen dan pelarut kalium. Jika bakteri unggul tersebut bersifat endosimbiotik fakultatif, maka akan melakukan penetrasi ke dalam jaringan tanaman yang dimulai dari lapisan luar tanaman dengan mencerna

lapisan kutikula dan epidermis secara enzimatik. Setelah itu, bakteri tersebut akan menyatu dengan jaringan tanaman dan akan terus memproduksi auksin selama tanaman itu hidup.

Pemahaman terhadap fitohormon pada masa kini telah membantu peningkatan hasil pertanian dengan ditemukannya beberapa jenis mikroba yang dapat digunakan untuk produksi fitohormon alami dan berbagai macam zat sintetis yang memiliki pengaruh yang sama dengan fitohormon alami. Aplikasi fitohormon (zat pengatur tumbuh) dalam pertanian modern antara lain mencakup pengamanan hasil (untuk meningkatkan ketahanan tanaman), menyeragamkan waktu berbunga/berbuah, memperbesar ukuran produk dan meningkatkan kualitas produk pertanian.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri rizosfer dan endofit yang mempunyai aktivitas tinggi dalam menghasilkan fitohormon IAA dan menguasai teknologi produksi fitohormon IAA dari isolat bakteri rizosfer dan bakteri endofit.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Isolasi bakteri rizosfer

Bakteri rizosfer diisolasi dari sampel tanah rizosfer tanaman buah-buahan (jambu biji, mangga, nanas) dan tanaman sayuran (cabe, kacang panjang, kangkung). Sampel tanah rizosfer diambil dari daerah sekitar Serpong. Cara isolasi bakteri rizosfer dilakukan menggunakan metode Rao (1996) sebagai berikut: sampel tanah rizosfer (tanah yang menempel pada bulu-bulu akar tanaman) ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 9 ml akuades steril. Larutan tersebut diencerkan secara bertingkat sampai 10^{-4} , dan dari pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} diambil 100 μ l untuk ditumbuhkan dalam media *Nutrient Agar* (NA) dengan metode *spread plate*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C, selama 2 hari. Setelah diinkubasi, koloni bakteri yang tumbuh dipindahkan ke medium NA yang baru secara berulang-ulang sampai diperoleh isolat murni bakteri rizosfer.

2.2. Isolasi bakteri endofit

Bakteri endofit diisolasi dari ranting dan akar tanaman buah-buahan (belimbing, mangga dan rambutan) dan sayuran (kangkung dan taoge). Cara isolasi bakteri endofit dilakukan mengikuti metode Strobel (2003) dan Lee *et al.* (2005) sebagai berikut: Mula-mula dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara sampel ranting dan akar tanaman dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Sampel tanaman yang telah dicuci dipotong-potong masing-masing sepanjang 1 cm.

Potongan sampel tanaman disterilisasi permukaannya dengan direndam dalam larutan etanol 75 % selama 1 menit, kemudian dalam larutan pemutih (*clorox*, 5,25 % sodium hypochlorite) selama 5 menit, dan terakhir direndam dalam etanol 75 % selama 0,5 menit. Potongan ranting dan akar yang telah disterilisasi permukaannya diletakkan di atas kertas tissue steril dan dibiarkan hingga kering di udara. Setelah kering, potongan ranting dan akar diletakkan di atas kaca obyektif steril dan dibelah secara melintang sama besar. Tiap-tiap bagian diletakkan di atas media NA steril dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 2 hari hingga bakteri tumbuh. Koloni bakteri yang tumbuh dari potongan sampel dan mempunyai ciri-ciri koloni yang berbeda dimurnikan dengan memindahkan ke dalam media NA yang baru sampai diperoleh isolat murni. Selanjutnya isolat murni bakteri endofit dipindahkan pada media NA miring dalam tabung reaksi.

2.3. Kultur bakteri dan proses ekstraksi IAA

Seluruh isolat bakteri diseleksi kemampuannya dalam menghasilkan fitohormon IAA. Isolat bakteri ditumbuhkan dalam kultur cair Medium Minimal (MM) dengan penambahan 1 g/l triptofan. Komposisi medium MM (Lacobellis *et al.*, 1998) dalam 1 liter akuades terdiri dari 5 g glukosa, 3 g K_2HPO_4 , 1 g NH_4Cl , 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g sodium sitrat dan 1 g triptofan. pH medium diatur menjadi 6,8 - 7, kemudian dimasukkan ke dalam beberapa labu Erlenmeyer ukuran 100 ml dengan volume masing-masing 20 ml dan ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 250 ml dengan volume masing-masing 50 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 20 menit. Kultur starter dibuat dengan menginokulasikan secara aseptik sebanyak 1 ose isolat murni bakteri dari media agar miring NA ke dalam Erlenmeyer yang berisi 20 ml medium MM, kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar selama 1 hari. Selanjutnya sebanyak 3 ml dari kultur starter diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium MM dan diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar selama 5 hari. Kultur cair bakteri yang telah diinkubasi selama 5 hari disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 25 menit. Fitohormon IAA dari supernatan bakteri diekstrak dengan etil asetat yang dilakukan sebanyak 4 kali dengan volume etil asetat sama dengan volume supernatan bakteri. Fraksi etil asetat dievaporasi hingga kering dengan rotapavor. Ekstrak yang diperoleh disuspensikan dalam 300 µl metanol *glacial*.

2.4. Pengujian Aktivitas IAA Secara Kualitatif

Adanya aktivitas IAA dalam larutan ekstrak bakteri dideteksi secara kualitatif menggunakan Thin Layer Chromatography (TLC) (Ahmad *et al.*, 2005) sebagai berikut: Padatan pendukung yang digunakan adalah plat *silica gel* yang diberi bahan berfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm (GF_{254}), sedangkan eluen yang digunakan adalah campuran kloroform : etil asetat : asam format (50:40:10,v/v). Plat *silica gel* GF_{254} berukuran panjang 10 cm dan lebarnya sesuai dengan jumlah senyawa yang akan ditotol. Kedua ujung plat diberi garis dengan pensil dengan jarak 0,5 cm untuk menentukan batas bawah dan batas atas. Plat TLC diberi tanda sesuai dengan senyawa IAA standar dan kode sampel (ekstrak bakteri) pada batas bawah dengan jarak 0,5 cm. Sampel, IAA standar dan kontrol (medium MM) ditotolkan pada titik sesuai dengan nama pada batas bawah plat *silica gel* GF_{254} . Plat *silica gel* kemudian dielusidasi dari batas bawah dengan eluen. Setelah dielusidasi, plat *silica gel* kemudian diangin-anginkan hingga kering. Setelah kering, plat *silica gel* disemprot dengan reagent Ehrlich. Reagent Ehrlich dibuat dengan melarutkan 1 g p-dimetil-amino-benzaldehid dan 20 ml HCl pekat dalam 95 ml etanol 96 %. Plat *silica gel* disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Plat *silica gel* dipanaskan di atas penangas hingga spot-spot IAA terlihat jelas. Spot-spot IAA dilingkari dengan pensil.

2.5. Pengujian Aktivitas IAA Secara Kuantitatif

Konsentrasi IAA dalam larutan ekstrak bakteri ditentukan secara kuantitatif menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). HPLC yang digunakan merk Shimadzu, model C-R4A Chromatopac. Prosedur pengujian mengikuti metode Lacobellis *et al.* (1998), sebagai berikut: Eluen yang digunakan dibuat dari campuran metanol dan air (*waters*) dengan perbandingan 60 : 40 v/v kemudian disaring dengan membran selulosa asetat dengan porositas 0,2 µm. Sebanyak 0,0025 g IAA standar dilarutkan dalam 20 ml metanol *glacial* dan diencerkan secara bertahap dengan metanol *glacial* dengan perbandingan 1 : 1. Sampel, eluen dan IAA standar disonikasi selama 15 menit. Kemudian eluen di-*running* dalam kolom HPLC shimpak CLC-ODS C-18 dengan diameter 0,6 mm dan ditunggu selama 10 menit. Sebanyak 10 µl IAA standar dengan berbagai konsentrasi disuntikan ke dalam kolom HPLC. Setelah itu, sebanyak 10 µl sampel pada berbagai pengenceran disuntikan ke dalam kolom HPLC. Kondisi pengukuran dilakukan pada suhu kolom

40°C, kecepatan alir 1 ml/menit dan panjang gelombang 280 nm. Hasil yang positif ditunjukkan dengan waktu retensi kromatogram sampel relatif sama dengan waktu retensi kromatogram IAA standar. Konsentrasi fitohormon IAA yang dihasilkan dapat dihitung dengan menggunakan variabel area IAA standar, area sampel dan faktor pengencerannya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi bakteri penghasil Fitohormon IAA

Hasil isolasi bakteri rizosfer dan bakteri endofit dari beberapa tanaman buah-buahan dan sayuran diperoleh 34 isolat murni bakteri yang terdiri dari 25 isolat bakteri rizosfer dan 9 isolat bakteri endofit. Isolat murni bakteri yang telah diperoleh ditumbuhkan dan dipelihara dalam medium NA.

Pada tahap isolasi bakteri, untuk mendapatkan isolat murni dilakukan pemisahan koloni yang tumbuh pada media NA dalam cawan petri berdasarkan ciri-ciri koloni yang berbeda. Ciri-ciri koloni tersebut meliputi bentuk, tepian, warna, bau, elevasi, dan diameter koloni bakteri. Koloni bakteri yang mempunyai ciri-ciri berbeda dipindahkan lagi dalam media NA yang baru dalam cawan petri dengan metode penggoresan kuadran sampai diperoleh isolat murni bakteri.

Untuk mendapatkan bakteri yang benar-benar berasal dari rizosfer, tidak dianjurkan mengambil tanah dari akar lateral (akar utama), tapi tanah yang menempel pada bulu-bulu akar, karena melalui bulu-bulu akar itulah tanaman mengeluarkan eksudat yang kaya akan nutrisi bagi bakteri. Agar lebih mudah mendapatkan tanah rizosfer, sebaiknya kita mengambil sampel di tanah yang kering karena tanah yang menempel pada bulu-bulu akar akan terlihat lebih basah dari pada tanah yang jauh dari bulu-bulu akar. Basahnya tanah yang menempel pada akar tersebut karena akar tanaman mengeluarkan eksudat ke tanah. Adapun jangkauan tanah basah akibat eksudat setiap tanaman berbeda-beda, tergantung ukuran akar tanaman dan proses fisiologis tanaman.

Dalam pengambilan sampel tanah rizosfer maupun bagian tanaman untuk diisolasi bakteri endofitnya, agar dapat diperoleh bakteri lokal yang unggul sebaiknya dipilih dari tanaman yang memiliki keunggulan, misalnya tanaman yang dapat tumbuh subur pada daerah yang gersang walaupun tidak dilakukan pemupukan. Diduga tanaman tersebut bersimbiosis dengan beberapa jenis bakteri yang bermanfaat bagi tanaman. Manfaat bakteri tersebut antara lain dapat membantu tanaman dalam penyerapan unsur hara dari dalam tanah, menghasilkan hormon tumbuh,

penambat nitrogen dan meningkatkan ketahanan tanaman terhadap serangan hama dan penyakit.

3.2. Pengujian Aktivitas Fitohormon IAA

Pengujian aktivitas bakteri dalam menghasilkan fitohormon IAA dilakukan secara kualitatif menggunakan TLC dan secara kuantitatif dengan metode HPLC. Hasil analisis menggunakan TLC dan HPLC menunjukkan bahwa dari 34 isolat bakteri yang diuji, 20 isolat bakteri dapat menghasilkan fitohormon auksin jenis IAA dengan konsentrasi yang berbeda-beda (Tabel 1).

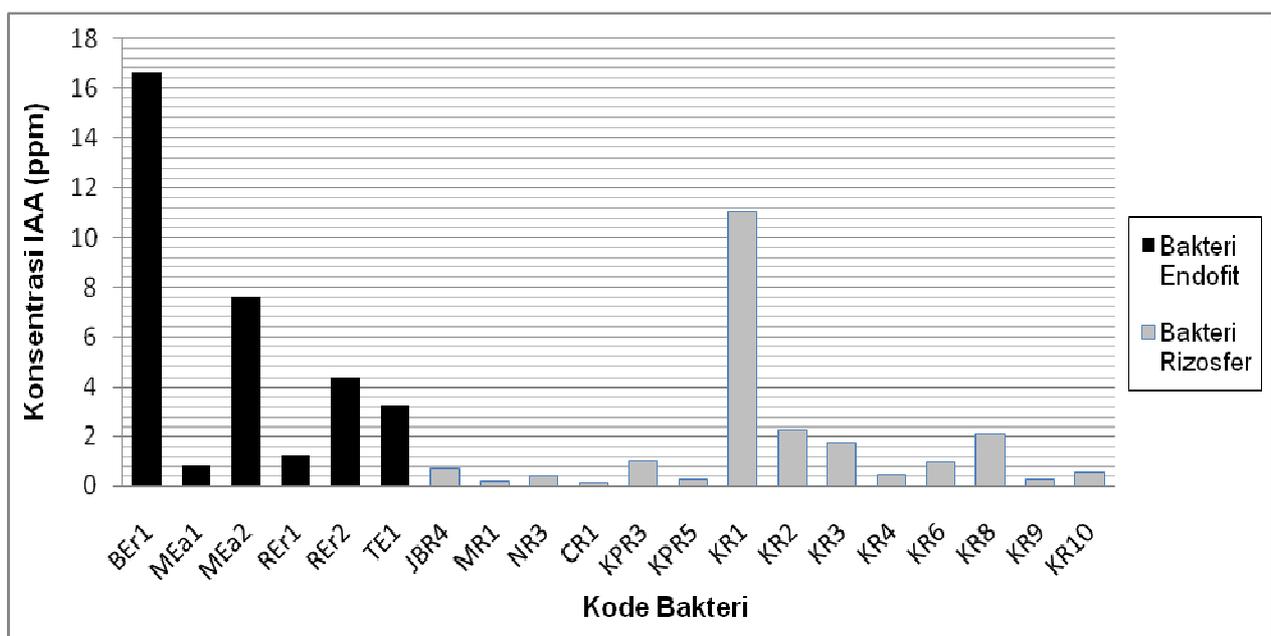
Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas IAA dari bakteri rizosfer dan bakteri endofit

No	Jenis tanaman	Bagian tanaman	Kode bakteri	Hasil TLC	Hasil HPLC (ppm)	
1	Belimbing	Endofit ranting	BEr1	+	16,71	
2	Jambu biji	Rizosfer	JBR1	-	-	
			JBR2	-	-	
			JBR3	-	-	
			JBR4	+	0,72	
3	Mangga	Rizosfer	MR1	+	0,21	
			Endofit akar	MEa1	+	0,78
			MEa2	+	7,64	
4	Nanas	Rizosfer	NR1	-	-	
			NR2	-	-	
			NR3	+	0,39	
5	Rambutan	Endofit ranting	REr1	+	1,28	
			REr2	+	4,41	
6	Cabe	Rizosfer	CR1	+	0,16	
			CR2	-	-	
7	Kacang panjang	Rizosfer	KPR1	-	-	
			KPR2	-	-	
			KPR3	+	1,02	
			KPR4	-	-	
			KPR5	+	0,31	
8	Kangkung	Rizosfer	KR1	+	10,99	
			KR2	+	2,25	
			KR3	+	1,77	
			KR4	+	0,44	
			KR5	-	-	
			KR6	+	0,99	
			KR7	-	-	
			KR8	+	2,09	
			KR9	+	0,26	
			KR10	+	0,58	
9	Taoge	Endofit akar	KEa1	-	-	
			KEa2	-	-	
9	Taoge	Endofit	TE1	+	3,24	
			TE2	-	-	

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa konsentrasi IAA yang dihasilkan berkisar antara 0,16-16,71 ppm. Isolat bakteri endofit ranting tanaman belimbing (BEr1) mempunyai kemampuan paling tinggi dalam menghasilkan fitohormon IAA yaitu dengan konsentrasi 16,71 ppm. Selain BEr1, ada dua isolat lagi yang dapat menghasilkan konsentrasi IAA cukup tinggi yaitu isolat bakteri rizosfer tanaman kangkung (KR1) dengan konsentrasi 10,99 ppm dan isolat bakteri endofit akar tanaman mangga (MEa2) dengan konsentrasi 7,64 ppm. Konsentrasi fitohormon IAA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BEr1 (16,71 ppm) lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Fett *et al.* (1987) yang menggunakan bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hanya menghasilkan konsentrasi IAA sebesar 4,34 µg/ml (4,34 ppm). Hasil tersebut juga masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian Ahmad *et al.* (2005) yang menggunakan isolat bakteri *Azotobacter* dan medium dengan penambahan triptofan 1 mg/ml, konsentrasi IAA yang dihasilkan sebesar 1,47-14,36 µg/ml. Namun, jika dibandingkan dengan hasil penelitian Ahmad *et al.* (2005) yang menggunakan bakteri *Pseudomonas*, maka hasilnya hampir sama bahkan lebih kecil, karena konsentrasi IAA yang dihasilkan sebesar 10,4–28,8 µg/ml.

Berdasarkan data hasil penentuan konsentrasi IAA yang dihasilkan dapat dilihat bahwa ada kecenderungan beberapa isolat bakteri endofit baik endofit ranting maupun endofit akar dapat menghasilkan konsentrasi IAA yang lebih tinggi dibanding isolat bakteri rizosfer (Gambar 1). Dari 9 isolat bakteri endofit yang diuji, ada 6 isolat

yang mempunyai aktivitas menghasilkan fitohormon IAA dengan konsentrasi sebesar 0,78-16,71 ppm. Sedangkan dari 25 Isolat bakteri rizosfer, ada 14 isolat yang dapat menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang sebagian besar lebih rendah dibanding isolat bakteri endofit, kecuali pada isolat bakteri rizosfer tanaman kangkung nomor 1 (KR1) yang dapat menghasilkan konsentrasi IAA cukup tinggi yaitu 10,99 ppm. Hal tersebut dapat disebabkan karena isolat bakteri endofit yang diuji diisolasi dari jaringan meristematik tanaman yang banyak menghasilkan fitohormon IAA. Bakteri endofit hidup secara simbiotik dengan tanaman inangnya sehingga mempunyai hubungan yang erat dan spesifik serta dapat mempunyai sifat yang sama dengan jaringan tanaman inangnya. Sedangkan bakteri rizosfer belum tentu mempunyai sifat yang sama dengan tanaman inangnya. Interaksi antara bakteri endofit dengan tanaman inangnya melalui transfer materi genetik, sedangkan bakteri rizosfer dengan tanaman inangnya dimediasi oleh transfer nutrisi. Mekanisme transfer materi genetik antara mikroba endofit dengan tanaman inangnya dijelaskan oleh Nester dan Liu (2006) pada mekanisme biosintesis auksin karena infeksi bakteri *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman. Bakteri tersebut mempunyai Ti-plasmid yang didalamnya terdapat T-DNA yang mengandung gen Tms 1 dan Tms 2. Pada saat infeksi, T-DNA ditransfer ke dalam sel tanaman inang dan menyatu dengan genom dalam inti sel tanaman. Kedua gen tersebut menuju sitosol dan mensintesis 2 jenis enzim. Gen tms-I mensintesis enzim Triptofan-mono-oksigenase yang mengkonversi triptofan menjadi Indole-3-



Gambar 1. Aktivitas Fitohormon IAA (ppm) dari Beberapa Isolat Bakteri Endofit dan Bakteri Rizosfer

acetamide, sedangkan gen *tms-II* mensintesis enzim Indole acetamide hydrolase yang mengkonversi Indole-3-Acetamide menjadi Indole-3-Acetic Acid (IAA). Kedua gen tersebut disebut *Root-inducing genes (Roi-genes)* atau gen yang merangsang pertumbuhan akar.

Jika ditinjau dari segi komposisi media yang digunakan dan kondisi proses produksi IAA, maka konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh isolat-isolat bakteri tersebut belum bisa dijadikan sebagai dasar untuk menilai keunggulan suatu isolat bakteri dalam menghasilkan fitohormon IAA. Hal tersebut karena komposisi media dan kondisi proses produksi (temperatur, pH, kecepatan agitasi dan waktu inkubasi) yang digunakan pada penelitian ini masih dibuat sama untuk setiap isolat bakteri. Selain isolat bakteri, komposisi media dan kondisi proses produksi berpengaruh terhadap konsentrasi IAA yang dihasilkan. Setiap isolat bakteri membutuhkan komposisi media dan kondisi proses yang optimal untuk dapat menghasilkan fitohormon IAA secara maksimal.

Pada komposisi medium minimal (MM), kandungan glukosa hanya 5 g/l akuades, hal ini bertujuan untuk membatasi pertumbuhan populasi sel bakteri, memperpendek fase logaritmik dan memperpanjang fase stasioner. Jadi kandungan glukosa diatur hanya cukup untuk pertumbuhan sel bakteri saja. Jika glukosa tersebut habis, maka sel bakteri akan menggunakan triptofan sebagai sumber energi. Pada fase ini, sel bakteri mulai menghasilkan IAA dengan cara memproduksi enzim Triptofan-mono-oksigenase yang mengkonversi triptofan menjadi Indole-3-Acetamide dan enzim Indole acetamide hydrolase yang mengkonversi Indole-3-Acetamide menjadi Indole-3-Acetic Acid (IAA). Sodium sitrat dalam medium berfungsi sebagai koenzim Triptofan-mono-oksigenase dan Indole-3-acetamide hydrolase yang dihasilkan oleh bakteri penghasil IAA. Sedangkan K_2HPO_4 dan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ selain sebagai sumber fosfor dan magnesium juga merupakan buffer fosfat yang berfungsi untuk menjaga agar konsentrasi ion H^+ pada kultur cair bakteri tidak berubah. Pada tahap produksi fitohormon IAA, inkubasi dilakukan pada kondisi gelap, hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya degradasi IAA yang dihasilkan bakteri akibat intensitas cahaya yang tinggi.

Pengujian aktivitas fitohormon IAA secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan TLC. Senyawa yang terkandung dalam sampel ekstrak bakteri tidak hanya IAA saja tetapi masih tercampur senyawa-senyawa lain. TLC dapat digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Prinsip dari teknik pemisahan ini adalah perbedaan kelarutan komponen-komponen pada sampel, plat TLC dan

eluen yang dipakai. Setelah sampel diketahui secara kualitatif mengandung fitohormon IAA, maka pengujian selanjutnya adalah menggunakan HPLC untuk mengetahui konsentrasi IAA yang dihasilkan. Berdasarkan hasil pengujian HPLC dapat ditentukan isolat bakteri rizosfer dan endofit yang mempunyai aktivitas tinggi dalam menghasilkan fitohormon IAA.

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa bakteri rizosfer dan bakteri endofit dapat menghasilkan fitohormon IAA. Dari 34 isolat bakteri yang diuji aktivitasnya, 20 isolat bakteri dapat menghasilkan fitohormon IAA dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Isolat bakteri endofit yang diisolasi dari ranting tanaman belimbing (BEr1) mempunyai aktivitas tertinggi dalam menghasilkan fitohormon IAA, yaitu dengan konsentrasi IAA sebesar 16,71 ppm. Selain isolat bakteri BEr1 terdapat 2 isolat bakteri yang dapat menghasilkan konsentrasi IAA cukup tinggi yaitu isolat bakteri rizosfer tanaman kangkung (KR1) dengan konsentrasi IAA 10,99 ppm dan isolat bakteri endofit akar tanaman mangga (MEa2) dengan konsentrasi IAA 7,64 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad F., I. Ahmad & M.S. Khan. 2005. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turk J Biol.*, 29, 29-34.
- Akbari, G.A., S.M. Arab, H. A. Alikhani, I. Allahdadi and M.H. Arzanesh. 2007. Isolation and Selection of Indigenous *Azospirillum* spp. And the IAA of Superior Strains Effects on Wheat Roots. *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (4): 523-529.
- Dascaluc. 2002. Hormones and Synthetic Plant Growth Regulators in Agriculture. Institute of Genetics and Plant Physiology, Academy of Sciences of Moldova, 20 Padurii str., Chisinau, Moldova.
- Fett, W.F., F.O. Stanley, and F.D. Michael. 1987. Auxin Production by Plant-Pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 53, No. 8, pp.1839-1845.
- Kutschera, U. 2007. Plant-Associated *Methylobacteria* as Co-Evolveg Phytosymbionts Institute of Biologi, University

of Kassel; Heinrich-Plett-Str. 40: 34109 Kassel, Germany.

Lacobellis, N.S., A. Caponero and A. Evidente. 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* Strains Isolated from Ash. *Plant Pathology*, 47, 73-83.

Lee, K.D., Y. Bai, D. Smith, S.S. Han and Supanjani. 2005. Isolation of Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Bean Nodules. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 1(3): 232-236.

Leveau, J.H.J. and S.E. Lindow. 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.71 No.5. May 2005, p. 2365-2371.

Nester E. W. and P. Liu. 2006. Indoleacetic acid, a Product of Transferred DNA, Inhibits Vir Gene Expression and Growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. Departments of Microbiology and Biology, Box 357242, University of Washington, Seattle.

Rao, S. 1996. Root Exudation and Rhizosphere Biology. Department of Plant Biology and Plant Biotechnology Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio.

Strobel, G.A. 2003. Endophytes as Sources of Bioactive Products. *Microbes and Infections*, 5, 535-544.

Strobel, G.A. 2003. Endophytes as Sources of Bioactive Products. *Microbes and Infections*, 5, 535-544.

Teale W. D., A. P. Ivan and P. Klaus. 2006. Auxin in Action: Signaling, Transport and the Control of Plant Growth and Development. Institut für Biologie II/Botanik, Schänzlestrasse, 79104 Freiburg, Germany.

Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva, and A.I. Netrusov. 2005. Auxin Production by Bacteria Associated with Orchid Roots. *Microbiology*, Vol. 74, No. 1, pp. 46-53.