

Potensi Isolat Bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* dalam Memproduksi Hormon *Indole Acetic Acid* (IAA)

Potential Isolates of Endophytes Bacteria (B3), Rhizobium, Azotobacter, and Azospirillum in producing IAA

Rantika Nurcahyanti*, Mahanani Tri Asri, dan Sari Kusuma Dewi

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

* e-mail: rantikanurcahyanti@mhs.unesa.ac.id

ABSTRAK

Hormon IAA merupakan hormon yang dapat memacu pertumbuhan tanaman. Hormon IAA dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri, baik bakteri simbiotik yaitu bakteri Endofit (B3) dan *Rhizobium* maupun bakteri nonsimbiotik, yaitu *Azotobacter* dan *Azospirillum*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan kemampuan setiap isolat bakteri dalam memproduksi hormon IAA, mengetahui fluktuasi yang terjadi selama lima hari masa inkubasi dan mendeskripsikan hubungan antara konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan dengan jumlah sel bakteri pada setiap isolat. Potensi isolat bakteri dalam memproduksi hormon IAA diperoleh dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm yang dilakukan setiap hari selama lima hari masa inkubasi. Jumlah sel bakteri dapat dihitung menggunakan haemositometer. Konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan dan jumlah sel bakteri pada setiap isolat selanjutnya dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa konsentrasi hormon IAA tertinggi diproduksi oleh bakteri *Azotobacter*, yaitu rata-rata sebesar 1,756 ppm, sedangkan terendah adalah bakteri *Rhizobium*, yaitu sebesar 1,342 ppm. Berdasarkan hasil perhitungan jumlah bakteri, diketahui bahwa jumlah sel bakteri berbanding lurus dengan konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan pada masa inkubasi yang sama. Semakin banyak juga jumlah sel bakterinya, maka semakin tinggi konsentrasi hormon IAA yang diproduksi oleh masing-masing bakteri selama lima hari masa inkubasi.

Kata kunci: *Azospirillum*; *Azotobacter*; bakteri Endofit (B3); hormon IAA; *Rhizobium*

ABSTRACT

Hormone IAA is a hormone that can support plant growth. The hormone IAA can be produced by some bacteria, both symbiotic bacteria, such as Endophytic bacteria (B3) and *Rhizobium* or nonsymbiotic bacteria, such as *Azotobacter* and *Azospirillum*. The purpose of this research was to describe production of the hormone Indole Acetic Acid (IAA) any isolate bacteria, know the fluctuations that occur during the five day incubation period and explain the relationship between concentration of the hormone IAA value and any bacteria cells number. Potential bacterial isolates in produced IAA is obtained by measuring the absorbance value every day for 5 days incubation period using a spectrophotometer with a wavelength of 530 nm. The each bacteria cells number can be calculated using haemocytometer. Concentration of the hormone IAA value and any bacteria cells number were analyzed descriptive quantitatively. The results showed that the highest concentration hormone IAA was produced by *Azotobacter* bacteria, which was an average 1.756 ppm, and the lowest value was *Rhizobium* bacteria 1.342 ppm. Based on calculation of bacteria cells number, it can be seen that the number of bacteria cells was proportional with the concentration of the hormone IAA produced at the same incubation period. The more the bacteria cells number, the higher the concentration of the hormone IAA produced by each bacteria.

Key words: *Azospirillum*; *Azotobacter*; endophytic bacteria (B3); IAA hormones; *Rhizobium*

PENDAHULUAN

Tanaman merupakan komponen penting dalam kehidupan masyarakat, salah satunya sebagai bahan makanan. Permintaan tanaman pangan mengalami peningkatan sehingga para petani berupaya untuk meningkatkan produktivitas tanaman agar dapat memenuhi permintaan konsumen. Namun, upaya yang dilakukan oleh petani adalah dengan

menggunakan pupuk buatan yang dapat merusak lingkungan (Munif dan Awaludin, 2011).

Kerusakan lingkungan karena penggunaan pupuk buatan tersebut dapat mengakibatkan menurunnya kesuburan tanah, terjadi pencemaran air dan tanah, dan penurunan keanekaragaman hayati (Munif dan Awaludin, 2011). Kerusakan lingkungan dapat diatasi dengan menggunakan pupuk alami berupa fitohormon salah satunya adalah hormon *Indole*

Acetic Acid (IAA). Hormon IAA adalah salah satu fitohormon auksin yang banyak terdapat di alam (Tsavkelova *et al.*, 2005). Hormon IAA akan menyebabkan pemanjangan dan pembesaran sel, serta mengubah ekspresi gen secara cepat. Hal tersebut menyebabkan sel di daerah pemanjangan memproduksi protein baru sebagai penyusun dinding sel, yang akan mempengaruhi perkembangan suatu tanaman (Champbell dan Reece, 2003). Hormon IAA dapat diproduksi oleh beberapa bakteri, baik bakteri simbiotik maupun bakteri non-simbiotik.

Bakteri simbiotik yaitu bakteri yang dapat hidup bersimbiosis dengan tanaman dan saling menguntungkan, misalnya bakteri Endofit (B3) dan *Rhizobium*. Sedangkan, bakteri non-simbiotik adalah kelompok bakteri yang hidup bebas di lingkungan (rizosfer), misalnya bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*. Produksi hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri rizosfer lebih tinggi dibandingkan dengan daerah nonrizosfer (Ahmad *et al.* 2005).

Hormon IAA yang diproduksi oleh bakteri tidak selalu mengalami peningkatan, namun produksi hormon IAA tersebut mengalami fluktuasi pada setiap waktu inkubasi (Lestari *et al.*, 2007). Bakteri dapat menggunakan kembali hormon IAA yang telah dibuat untuk mensintesis protein dan kegiatan fisiologi dalam sel (Thontowi *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* mampu menghasilkan IAA, tetapi diantara keempat bakteri tersebut belum diketahui bakteri yang paling optimal dalam memproduksi IAA. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui keterkaitan antara jumlah sel bakteri dengan produksi hormon IAA yang dihasilkan oleh setiap isolat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional karena tidak terdapat manipulasi pada variabel - variabel penelitian. Penelitian dilakukan pada tanggal 10-31 Maret 2018. Peremajaan bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi C9 FMIPA, Universitas Negeri Surabaya. Uji potensi masing-masing isolat bakteri dalam memproduksi hormon IAA dengan metode spektrofotometri dilakukan di Laboratorium Fisiologi Gedung C10 FMIPA, Universitas Negeri Surabaya.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kapas, kertas tisu, kaca benda, kaca

penutup, autoklaf, erlenmeyer, *beaker glass*, *vortex*, jarum ose, oven, pinset, lampu spiritus, inkubator, *aluminium foil*, gelas ukur, *shaker*, *hot plat*, pipet volume, botol media, *magnetic stirrer*, sentrifuge, *syringe*, kertas pH, *haemocytometer* dan spektrofotometer. Adapun bahan yang digunakan berupa isolat bakteri Endofit (B3), bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum*, media *Nutrient Agar*, reagen Salkowski, media *James Nitrogen Free Malat Bromthymol Blue* (JNFB), triptofan, akuades, alkohol 70%, alkohol 96%, *Methylene Blue* 0,01%, NaOH 1M, dan HCl 1M.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap pertama yaitu pembuatan media yaitu *Nutrient Agar* dan *James Nitrogen Free Malat Bromthymol Blue* (JNFB). Kedua media tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Tahap kedua, yaitu pembuatan kurva standar IAA. Diawali dengan membuat larutan IAA sintetik 2 ppm. Hormon IAA sintetik sebanyak 0,2 mg dilarutkan ke dalam 100 mL akuades. Stok tersebut selanjutnya diencerkan sehingga mendapatkan larutan IAA sintetik dengan konsentrasi 0,2 ppm; 0,4 ppm; 0,6 ppm; 0,8 ppm; 1 ppm; 1,2 ppm; 1,4 ppm; 1,6 ppm; 1,8 ppm; dan 2 ppm.

Tahap ketiga yaitu perhitungan jumlah sel bakteri hingga kerapatannya mencapai 10^6 sel/mL (Sutton, 2011). Setelah itu dilakukan pengujian dengan memasukkan 1ml masing-masing isolat bakteri yang telah dihitung kedalam media JNFB. Kultur isolat bakteri yang telah ditumbuhkan di media JNFB kemudian di setrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan reagen Salkowsky dengan perbandingan 2:1 untuk dianalisis kadar IAAnya. Kadar IAA dapat diketahui dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm (Anggara dkk, 2014). Kemudian nilai absorbansi IAA disubstitusikan dalam persamaan kurva standar IAA, yaitu $y=0,002 + 0,014x$, dengan y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi dalam ppm. Pengukuran dilakukan setiap hari, yaitu hari ke 0 sampai hari ke 5 masa inkubasi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui fluktuasi bakteri dalam memproduksi hormon IAA.

Data hasil pengukuran konsentrasi IAA dan perhitungan jumlah sel bakteri dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Nilai absorbansi IAA yang didapat dideskripsikan dan dihubungkan dengan hasil perhitungan jumlah sel bakteri pada masing-masing isolat dalam memproduksi hormon IAA.

HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh data mengenai hasil uji potensi isolat bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* dalam memproduksi hormon IAA dan data mengenai jumlah sel bakteri selama masa inkubasi. Konsentrasi IAA dihasilkan oleh bakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa setiap isolat bakteri dapat memproduksi hormon *Indole Acetic Acid* (IAA). Konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan selama masa inkubasi mengalami fluktuasi mulai hari ke-0 hingga hari ke-5. Pada hari pertama hingga hari ke-3 nilai konsentrasi hormon IAA meningkat, namun pada hari ke-4 hingga ke-5 mengalami penurunan. Bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter*, dan *Azospirillum* dapat memproduksi hormon IAA paling optimum pada masa inkubasi hari ke-3. Hal tersebut dapat disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1. diketahui rata-rata konsentrasi hormon IAA paling optimum yang dihasilkan oleh bakteri *Azotobacter* yaitu sebesar 1,756 ppm. Pada hari ke-3 bakteri *Azotobacter* mampu memproduksi hormon IAA sebesar 2,928 ppm. Pada hari ke-4 bakteri *Azotobacter* mengalami penurunan konsentrasi hormon IAA hingga hari ke-5 yaitu sebesar 1 ppm dan 0,642 ppm.

Rata-rata konsentrasi hormon IAA terendah dari keempat isolat bakteri tersebut adalah bakteri *Rhizobium* yaitu sebesar 1,342 ppm. Pada masa inkubasi hari ke-3 bakteri *Rhizobium* juga memiliki konsentrasi terendah dibandingkan dengan ke-3 bakteri lainnya yaitu sebesar 1,714 ppm. Namun, pada hari ke-5 masa inkubasi bakteri *Rhizobium* memiliki konsentrasi hormon IAA tertinggi yaitu 0,928 ppm. Selain itu isolat bakteri Endofit (B3) dan *Azospirillum* juga tidak memiliki konsentrasi

hormon IAA yang jauh berbeda, yaitu sebesar 1,599 ppm dan 1,556 ppm.

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa setiap isolat bakteri memiliki jumlah sel bakteri yang berbeda setiap harinya, seperti yang disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 2.

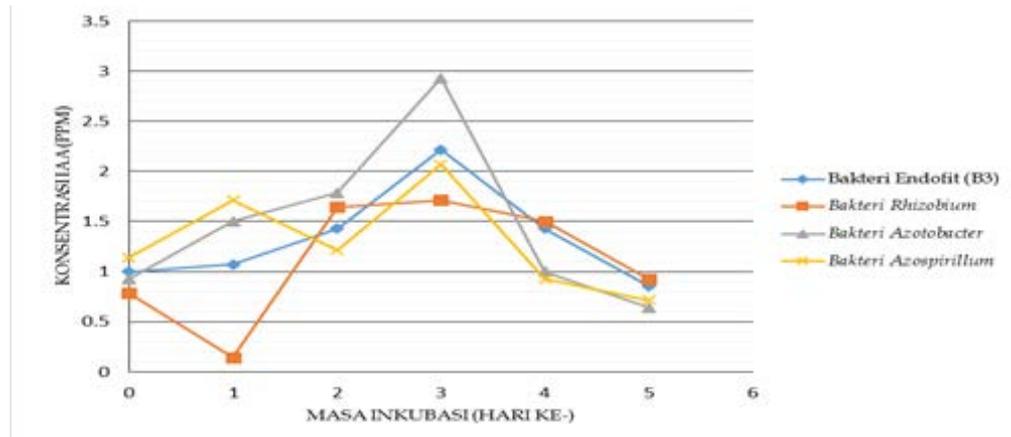
Jumlah sel bakteri pada hari ke-0 hingga hari ke-1 pada masing-masing isolat masih rendah (Gambar 2.). Hal ini dikarenakan bakteri berada pada tahap adaptasi. Peningkatan jumlah sel bakteri terus terjadi mulai hari ke-2 hingga hari ke-3 baik pada isolat bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum*. Pada masa hari ke-3 tersebut masing-masing bakteri memiliki jumlah sel paling optimum, karena bakteri berada pada tahap eksponensial. Jumlah sel bakteri menurun pada masa inkubasi hari ke-4 hingga hari ke-5. Pada masa inkubasi tersebut masing-masing bakteri berada pada tahap kematian, sehingga jumlah sel bakteri semakin menurun.

Hasil perhitungan jumlah sel bakteri masing-masing isolat menunjukkan fluktuasi yang berbeda namun berbanding lurus dengan produksi hormon IAA yang dihasilkan selama lima hari masa inkubasi. Hal tersebut telah disajikan dalam Gambar 3.

Konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan pada masa inkubasi paling optimum terjadi pada hari ke-3 yang diikuti dengan jumlah sel bakteri yang optimum. Pada masa inkubasi hari ke-5 perolehan konsentrasi hormon IAA yang produksi oleh masing-masing isolat bakteri rendah, yang diikuti juga penurunan jumlah sel bakteri pada hari tersebut. Hal ini menunjukkan terdapat hubungan antara banyaknya konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan dengan banyaknya jumlah sel bakteri.

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) oleh setiap bakteri selama 5 hari masa inkubasi

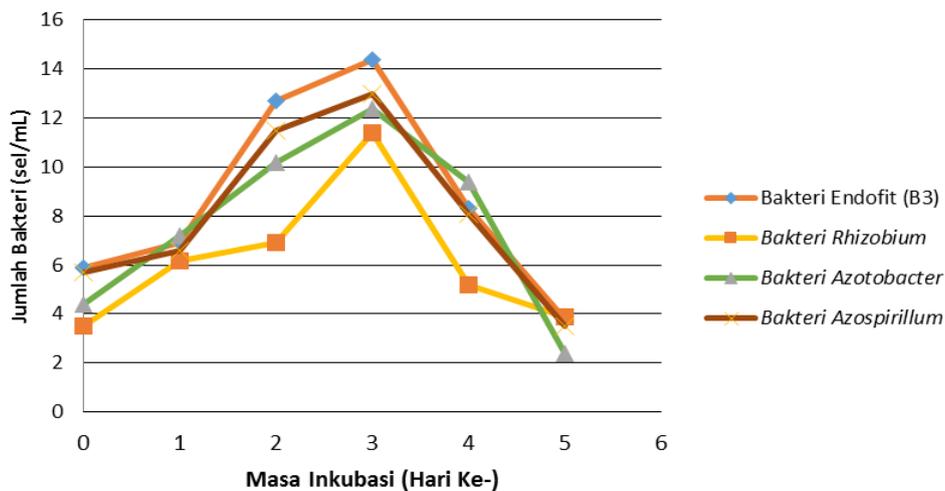
Isolat bakteri	Konsentrasi IAA (ppm) hari ke-						Rata-rata konsentrasi IAA
	0	1	2	3	4	5	
Endofit (B3)	1	1,071	1,428	2,214	1,428	0,857	1,599
<i>Rhizobium</i>	0,785	0,142	1,642	1,714	1,5	0,928	1,342
<i>Azotobacter</i>	0,928	1,5	1,785	2,928	1	0,642	1,756
<i>Azospirillum</i>	1,142	1,714	1,214	2,071	0,928	0,714	1,556



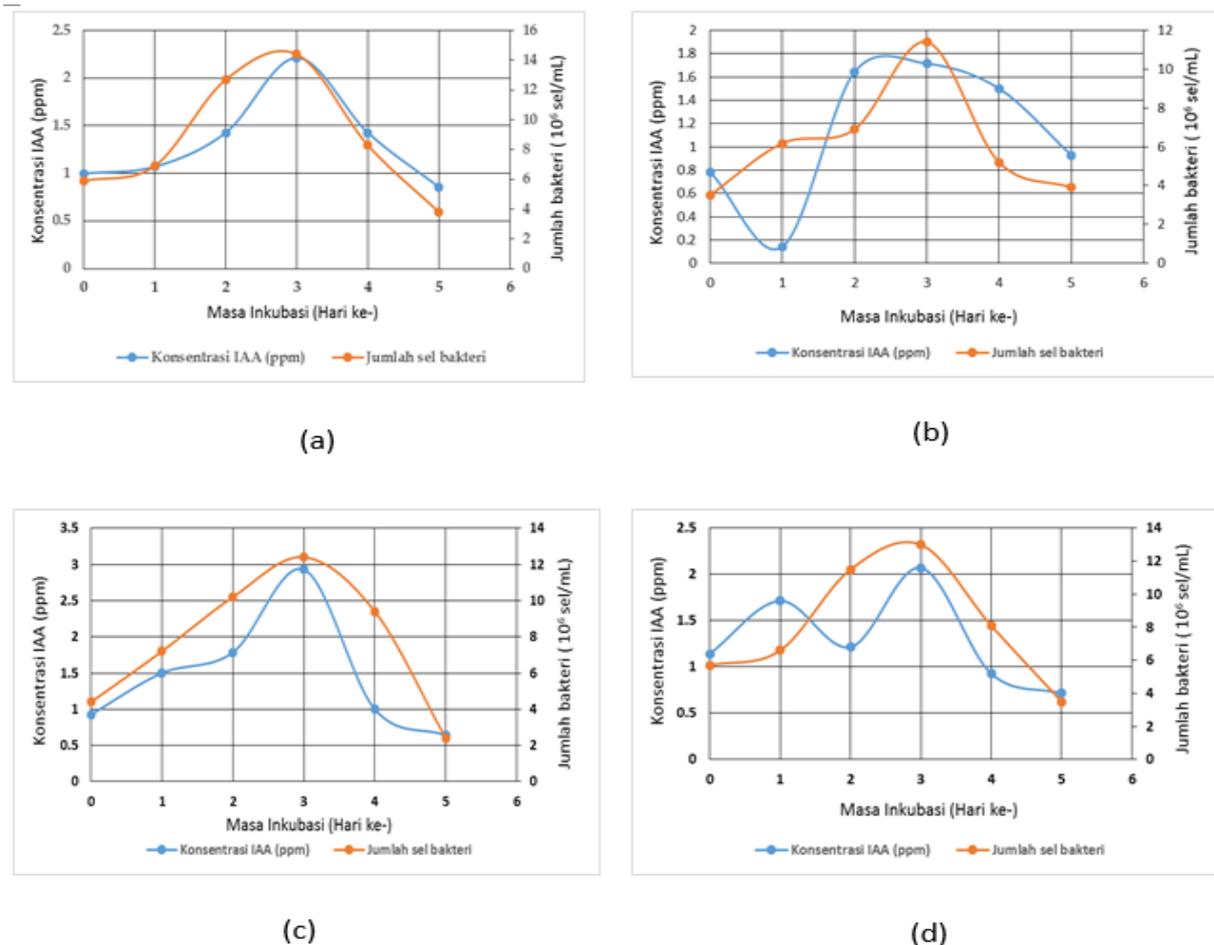
Gambar 1. Grafik konsentrasi hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) oleh masing-masing isolat bakteri selama 5 hari masa inkubasi

Tabel 2. Jumlah sel bakteri selama lima hari masa inkubasi pada masing-masing isolat bakteri.

Isolat bakteri	Jumlah bakteri (sel/mL) pada masa inkubasi hari ke-					
	0	1	2	3	4	5
Endofit (B3)	$5,9 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$12,7 \times 10^6$	$14,4 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
<i>Rhizobium</i>	$3,5 \times 10^6$	$6,18 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$11,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
<i>Azotobacter</i>	$4,4 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$10,2 \times 10^6$	$12,4 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
<i>Azospirillum</i>	$5,7 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$	$11,5 \times 10^6$	13×10^6	$8,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$



Gambar 2. Grafik jumlah sel bakteri selama 5 hari masa inkubasi pada isolat bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum*



Gambar 3. Grafik keterkaitan antara produksi hormon IAA (ppm) dengan jumlah bakteri (sel/mL) pada isolat (a) bakteri Endofit (B3), (b) *Rhizobium*, (c) *Azotobacter* dan (d) *Azospirillum* selama 5 hari inkubasi.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data pada bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum*, setiap isolat bakteri mampu menghasilkan hormon IAA selama masa inkubasi hari ke-0 hingga hari ke-5. Perbedaan laju pertumbuhan pada setiap bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya sifat fisiologis dan faktor genetik yang ada pada bakteri itu sendiri. Namun terdapat beberapa faktor lainnya yaitu ketersediaan nutrisi pada media, suhu, dan pH. Setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam memanfaatkan nutrisi yang ada pada media (Thontowi dkk., 2007). Pertumbuhan bakteri yang semakin cepat mengakibatkan proses sintesis hormon IAA lebih cepat pula sehingga konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan lebih tinggi (Suriaman, 2010).

Produksi hormon IAA pada masa inkubasi hari ke-3 oleh masing-masing isolat bakteri merupakan konsentrasi hormon IAA tertinggi yaitu mencapai tingkat optimum. Hal ini

dikarenakan bakteri berada pada tahap eksponensial sampai tahap stasioner. Pada kedua tahap ini bakteri terus mengalami pertumbuhan sehingga produksi hormon IAA yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri juga meningkat (Suharyanto dkk., 2009).

Produksi hormon IAA mengalami penurunan pada masa inkubasi hari ke-4 dan ke-5, hal ini dikarenakan bakteri memasuki tahap kematian. Pada tahap ini ketersediaan nutrisi pada media pertumbuhan berkurang, namun sisa metabolisme yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri terus meningkat sehingga menyebabkan keracunan. Keracunan terjadi akibat adanya akumulasi bahan-bahan beracun yang dapat menyebabkan bakteri mengalami kematian dan terjadi penurunan produksi hormon IAA (Garbutt, 1997).

Pada bakteri Endofit (B3), *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* selama masa inkubasi mengalami kenaikan produksi hormon IAA yaitu hari ke-3 yang diikuti dengan jumlah sel bakteri

tertinggi juga terdapat pada masa inkubasi hari ke-3. Terjadi penurunan produksi IAA pada masa inkubasi hari ke-5 dan diikuti dengan jumlah sel bakteri yang rendah. Lestari *et al.*, (2007) menyatakan bahwa pada masa inkubasi sumber nutrisi yang cukup tinggi menyebabkan produksi hormon IAA meningkat, begitu pula sebaliknya. Penurunan sumber nutrisi pada media menyebabkan persaingan antar bakteri untuk tetap bertahan hidup, sehingga berpengaruh terhadap produksi IAA yang dihasilkan. Faktor lain yang dapat menyebabkan hal itu terjadi karena perbedaan jenis bakteri (Lay dan Hastowo, 1992).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa produksi hormon IAA tertinggi dihasilkan oleh isolat bakteri *Azotobacter* yaitu sebesar 1,756 ppm, kemudian diikuti oleh bakteri Endofit (B3), *Azospirillum* dan *Rhizobium* secara berturut-turut yaitu sebesar 1,599 ppm, 1,556 ppm, dan 1,342 ppm. Fluktuasi produksi hormon IAA dan jumlah bakteri terjadi mulai hari ke-1 hingga hari ke-3 masa inkubasi. Kemudian mengalami penurunan pada hari ke-4 hingga ke-5 yaitu memasuki tahap kematian. Keterkaitan antara jumlah bakteri dengan jumlah hormon IAA yang diproduksi oleh setiap isolat diketahui bahwa semakin banyak jumlah sel bakteri, maka semakin tinggi pula produksi hormon IAA yang diproduksi pada masa inkubasi lima hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad F, Ahmad M, dan Khan S, 2005. *Indole Acetic Acid* production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescent* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* 29: 29-34.
- Anggara BS, Yuliani, dan Lisdiana L, 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) dari Akar Tanaman Ubi Jalar (*Ipomea batatas*). *LenteraBio* 3(3): 160-167.
- Campbell NA, dan Reece JB, 2003. *Biology*. Edisi Kelima. Jakarta: Erlangga.
- Garbutt J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. London: Arnold.
- Hendaryono DPS, dan A Wijayani, 1994. *Kultur Jaringan (Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif Media)*. Kanisius. Yogyakarta.
- Lay BW, Hastowo S, 1992. *Mikrobiologi*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Lestari P, Susilowati DN, dan Riyanti EI, 2007. Pengaruh Hormon Asam Indol Asetat yang Dihasilkan *Azospirillum* sp. terhadap Perkembangan Akar Padi. *Jurnal AgroBiogen*. 3(2):66-72.
- Leveau JHJ, and Lindow SE, 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 : 2365-2371.
- Munif A, dan Awaludin H, 2011. Potensi Bakteri Endofit dan Rhizosfer dalam Meningkatkan Pertumbuhan Jagung. *Seminar Nasional Serealia*. IPB.
- Suharyanto, Panji T, dan Gusnaniar, 2009. Produksi IAA oleh *Rhizobium* sp. dalam Medium Sintetik dan Serum Lateks dengan Suplementasi Triptofan. *Menara Perkebunan*. 77(1): 13-22.
- Suriaman E, 2010. Potensi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum*) Dalam Memfiksasi N₂ di Udara dan Menghasilkan Hormon IAA (*Indole Acetic Acid*) Secara In Vitro. *Skripsi*. Tidak dipublikasikan. Malang: Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim.
- Sitompul SM dan B Guritno, 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sutton S, 2011. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*. 17:46-49.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI, 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *J Microbiol*. 74(1):55-6.