

KAJIAN BAKTERI PENGHASIL HORMON TUMBUH IAA SEBAGAI PUPUK ORGANIK HAYATI DAN KANDUNGAN IAA SELAMA PENYIMPANAN

Sarjiya Antonius, Dwi Agustyani, Hartati Imamuddin, Tirta Kumala Dewi, dan Nur Laili

Department of Microbiology, Research Center for Biology-Indonesian Institute of Sciences,
Cibinong Science Center-Cibinong
Jalan Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong Indonesia
sarj.antonius@gmail.com

ABSTRAK

Zat pengatur tumbuh (ZPT) tanaman sangat penting perannya dalam mendukung pengembangan dan pertumbuhan tanaman. Sudah pasti benih (biji) tidak akan berkecambah atau tumbuh dan berkembang tanpa ada peran dari ZPT. Rizobakteri pemacu tumbuh tanaman (RPTT) diketahui mampu menghasilkan hormone tumbuh, seperti auksin, sitokinin, dan gibberelin. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji rizobakteri pemacu tumbuh tanaman (RPTT) dalam menghasilkan IAA dan kandungan IAA pada pupuk organik setelah penyimpanan pada rentang waktu yang berbeda. Mikroba penghasil IAA telah diisolasi dari beragam ekosistem. Kemudian dikarakterisasi pengaruh prekursor Tryptophan terhadap kemampuan RPTT dalam memproduksi IAA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri penghasil IAA dapat diisolasi tidak hanya dari ekosistem perakaran, tetapi juga dari tanah tumpukan limbah tandan pisang. Bakteri RPTT yang diisolasi dari limbah tandan pisang menunjukkan aktifitas produksi IAA paling tinggi. Sekitar 10 isolat unggulan terpilih digunakan dalam formula pupuk organik hayati (POH) dengan bahan organik yang mudah didapat dan dari monitoring selama penyimpanan, ternyata kandungan IAA semakin meningkat ketika dalam penyimpanan.

Kata kunci: bakteri perakaran, zat pengatur tumbuh, pupuk organik hayati

PENDAHULUAN

Prinsip pupuk hayati adalah memanfaatkan mikroorganisme tertentu dalam tanah sebagai penghancur bahan organik, membantu proses mineralisasi atau bersimbiosis/bebas dengan tanaman dalam menambat/menyediakan unsur-unsur hara sehingga dapat memacu pertumbuhan tanaman. Mikroorganisme tanah tersebut juga dapat mengendalikan organisme pengganggu tanaman dan perombak persenyawaan agrokimia (Gunalan, 1996). Agen pupuk hayati digolongkan ke dalam rizobakteri pemacu tumbuh tanaman (RPTT) atau lazim disebut dengan *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). RPTT atau PGPR adalah kelompok bakteri rizosfer yang memiliki kemampuan mengkolonisasi rizosfer secara agresif serta memberikan keuntungan bagi tanaman. Fungsi dari PGPR dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman secara umum terbagi dalam tiga kategori, yaitu sebagai pemacu atau perangsang pertumbuhan (*biostimulant*) dengan mensintesis dan mengatur konsentrasi berbagai zat pengatur tumbuh, sebagai penyedia hara (*biofertilizer*) dengan menambat N_2 dari udara secara asimbiosis dan melarutkan hara P yang terikat di dalam tanah, dan sebagai pengendali patogen yang berasal dari tanah (*bioprotectant*) dengan cara menghasilkan berbagai senyawa atau metabolit anti patogen seperti *siderophore*, kitinase, antibiotik, dan sianida (Glick, 1995). Pemanfaatan isolat yang memiliki karakter serta kemampuan seperti di atas digunakan sebagai komposisi untuk membuat pupuk hayati majemuk. Pupuk hayati majemuk mengandung lebih dari satu jenis/strain mikroba, diantaranya adalah bakteri penambat N dan bakteri pelarut P yang juga mampu menghasilkan hormon pertumbuhan serta bakteri yang berperan sebagai agen biokontrol

(Kloepper, 1993).

Kelompok bakteri yang bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman secara langsung adalah kelompok bakteri yang mampu menghasilkan hormon tumbuhan seperti auksin, sitokinin, giberelin (Leveau dan Lindow, 2004). Beberapa strain bakteri dari genus *Azospirillum* memiliki kemampuan *phytostimulatri* (merangsang pertumbuhan tanaman). Beberapa mikroorganisme tanah yang menghasilkan IAA seperti *Azospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Azoarcus* sp., *Serratia* sp., *Cyanobacteria* dan bakteri sulfur dapat mendorong pertumbuhan tanaman (Rubio *et al.*, 2000). *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii* dan *A. paspali* mampu menghasilkan auksin (Azcon & Berea, 1976). Hal ini disebabkan karena bakteri tersebut mampu memproduksi fitohormon, yaitu IAA (Lestari *et al.*, 2007). Tumbuhan mungkin saja tidak mampu mencukupi kebutuhan auksin untuk pertumbuhannya secara optimal sehingga diperlukan tambahan hormon pemacu pertumbuhan dari luar. Menurut Patten dan Glick (2002) respon tanaman terhadap IAA yang dihasilkan mikroba berbeda-beda bergantung pada spesies tanaman dan konsentrasi IAA yang diberikan.

Biosintesis IAA oleh mikroba ditingkatkan oleh prekursor fisiologi tertentu yaitu L-Tryptophan (Husen, 2003). Produksi IAA tidak berfungsi nyata sebagai hormon dalam sel bakteri, dimungkinkan terdapat dalam sel bakteri karena hormon tersebut berperan penting dalam interaksi antara bakteri dan tanaman. Penelitian yang dilakukan Patten dan Glick (2002) diperoleh bahwa bakteri yang memproduksi IAA akan menstimulasi pertumbuhan sistem perakaran inang. Keuntungan dari asosiasi tanaman dengan bakteri adalah mensuplai sebanyak produk metabolit fiksasi karbon oleh tumbuhan yang telah hilang ke rizosfer sebagai eksudat. Konsentrasi IAA juga meningkat seiring dengan umur kultur sampai bakteri mencapai fase stasioner.

Tujuan penelitian adalah mengkaji rizobakteri pemacu tumbuh tanaman (RPTT) dalam menghasilkan IAA dan memonitor kandungan IAA pada pupuk organik hayati yang mengandung RPTT tersebut.

BAHAN DAN METODE

Isolasi bakteri

Bakteri penghasil IAA diisolasi dari sampel tanah dengan ekosistem yang berbeda yaitu: tanah bawah limbah tandan pisang (TP), tanah bawah tumpukan enceng gondok (EG), tanah perakaran tanpa pemupukan organik (nBFnVK), tanah perakaran yang diberi POH tanpa vermi-kompos (BFnVK), tanah perakaran tanpa POH dan diaplikasi vermi-kompos (nBFVK) dan tanah perakaran yang diaplikasi POH dan vermi-kompos (BFVK). Isolasi dilakukan dengan pengenceran berseri menggunakan metode *plate count*. Isolat yang diperoleh selanjutnya diuji kemampuannya dalam menghasilkan IAA secara kualitatif dan kuantitatif.

Analisis IAA secara kualitatif

Bakteri yang mampu menghasilkan IAA di uji secara kualitatif dengan metode kolorimetri menggunakan reagen *Salkowski* (Gordon dan Weber, 1951). Pembuatan reagen *Salkowski* menurut Gordon dan Weber, 1951 yaitu dengan mengambil 1 mL 0.5 M FeCl_3 ditambah 50 mL HClO_4 50% [v/v], selanjutnya disimpan dalam botol yang tidak tembus cahaya atau ditutup dengan aluminium foil. (FeCl_3 0.5M = 1.35 g/10 ml) (HClO_4 50% = 25 ml HClO_4 + 25 ml Aquades).

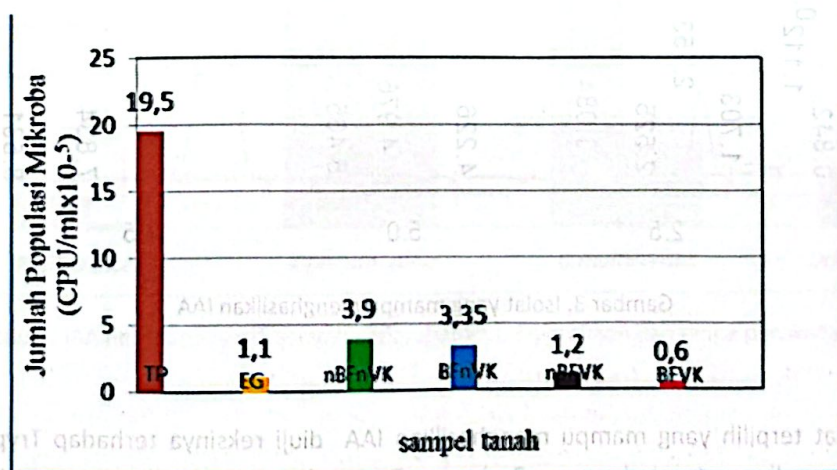
Analisis IAA secara kuantitatif

Analisis IAA secara kuantitatif menggunakan dua metode yaitu metode spektrofotometri dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Analisis dengan metode spektrofotometri menurut Gravel, Antoun dan Tweddel 2007 menggunakan 100 mL media *Tryptic Soy Broth* (TSB) 50 % (*half-strength*). Media yang telah steril tersebut diberi dua perlakuan yaitu ditambahkan precursor *L-Tryptophan* dan tanpa *L-Tryptophan*. Pada analisis IAA dengan metode spektrofotometri, konsentrasi IAA dari sampel dihitung berdasarkan kurva standar dengan standar IAA murni (Gravel, Antoun dan Tweddel, 2007). Sedangkan pada kegiatan analisis konsentrasi IAA dengan metode HPLC dilakukan dengan metode Mehnaz dan Lazarovits, (2006). Hasil evaporasi dianalisis menggunakan HPLC. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : asam asetat : akuabides (30:1:70 v/v/v). Kolom yang digunakan adalah C-18 *reverse phase* dengan detektor UV pada panjang gelombang 280 nm dan kecepatan alir 1,2 mL/ menit. Standar yang digunakan adalah larutan IAA murni yang diukur pada keadaan dan kondisi yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

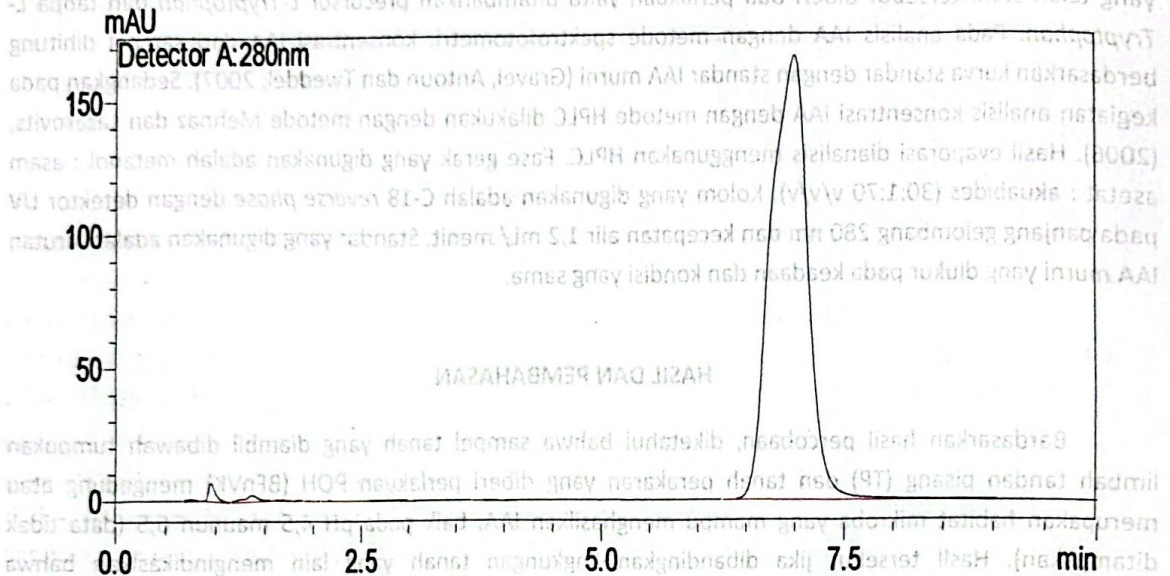
Berdasarkan hasil percobaan, diketahui bahwa sampel tanah yang diambil dibawah tumpukan limbah tandan pisang (TP) dan tanah perakaran yang diberi perlakuan POH (BFnVK) mengandung atau merupakan habitat mikroba yang mampu menghasilkan IAA, baik pada pH 4,5 maupun 6,5 (data tidak ditampilkan). Hasil tersebut jika dibandingkan lingkungan tanah yang lain mengindikasikan bahwa kemungkinan tanah di bawah tumpukan limbah tandan pisang mengandung nutrisi tertentu, seperti prekursor dalam sintesis zat pengatur tumbuh IAA. Kondisi tersebut merupakan habitat yang cocok untuk bakteri-bakteri penghasil zat pengatur tumbuh tersebut. Dalam pendeteksian awal mikroba penghasil IAA ini dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media TSB, yang kemudian setelah koloni tumbuh, kemudian dibasahi dengan larutan Salkovsky, sehingga koloni bisa menimbulkan warna pink.

Isolat bakteri yang tumbuh pada media TSB dan menunjukkan indikasi kemampuan mensintesis IAA, selanjutnya dimurnikan/dikucilkan. Isolat-isolat tersebut kemudian diseleksi lanjut dengan menumbuhkan pada media TSB cair yang diberi perkusor *L-Tryptophan*, dengan dipantau pertumbuhan bakteri dengan spektrofotometer dan secara reguler tiap 24 jam disampling untuk dilakukan pengukuran dengan metode spektrofotometri maupun dengan menggunakan HPLC.

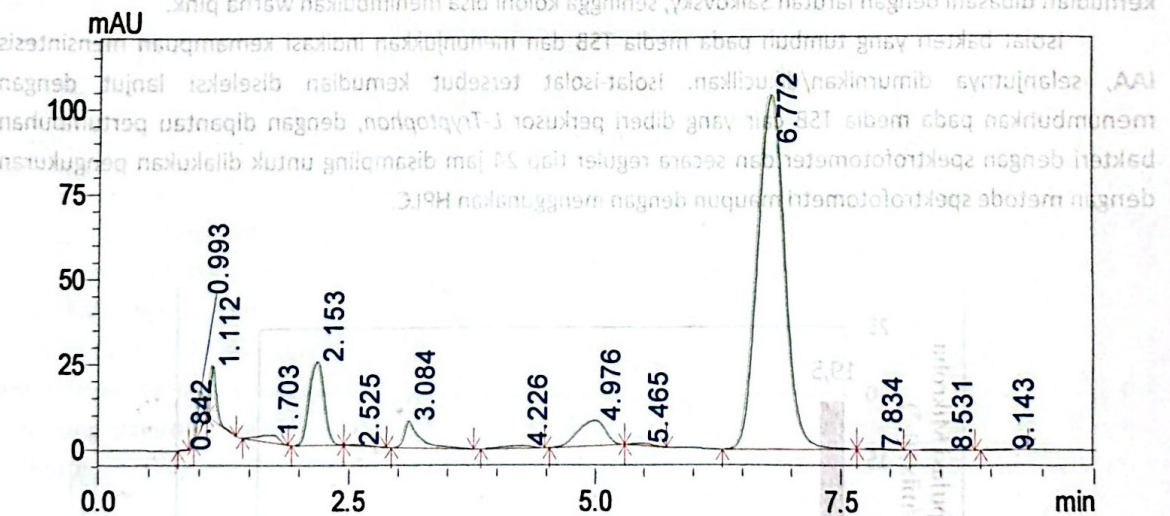


Gambar 1. Populasi Mikroba Inokulum Tanah Lampung Media *Tryptic Soy Broth* pH 4,5.

Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa beberapa isolat yang diuji mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi 0,8 ppm-91 ppm dan ada 1 isolat yang mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang tinggi walaupun tanpa precursor *L-Tryptophan*.



Gambar 2. Standar IAA



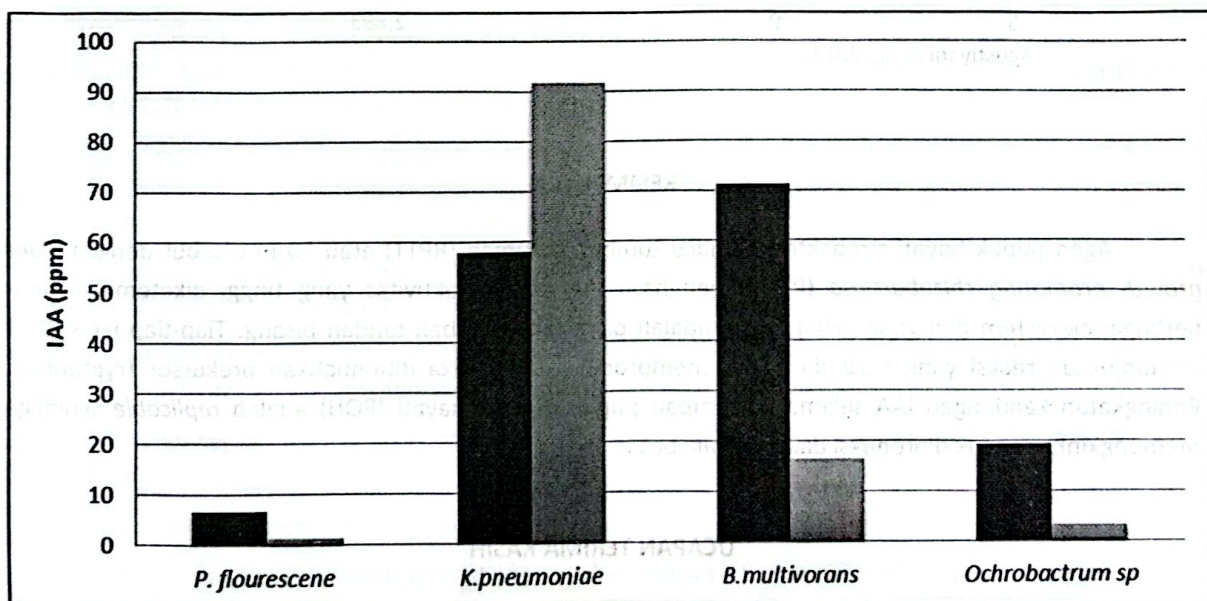
Gambar 3. Isolat yang mampu menghasilkan IAA

Isolat-isolat terpilih yang mampu menghasilkan IAA diuji reksinya terhadap Tryptophan sebagai prekursor dalam media pertumbuhannya. Prekursor Tryptophan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap produksi IAA dari masing-masing jenis RPTT (Gambar 4.). Kecuali *Klebsiela pneumoniae*, jenis RPTT

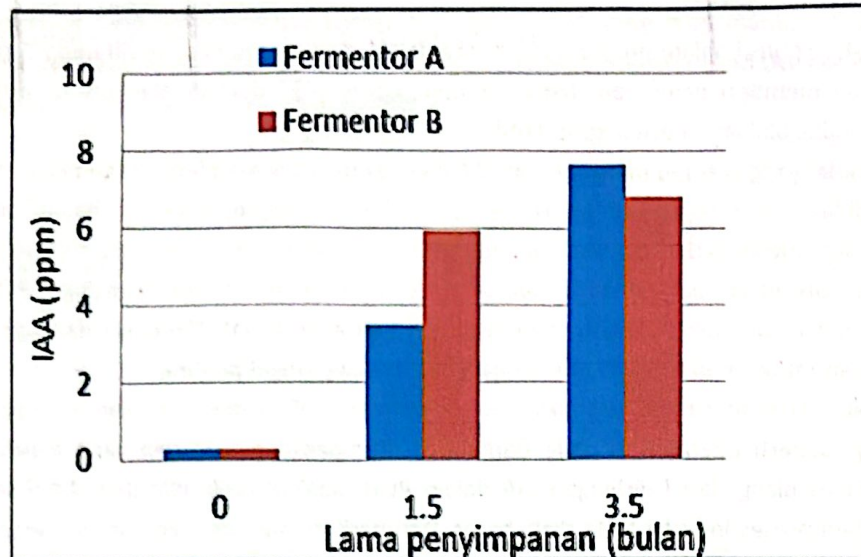
yang lain sangat responsif dalam produksi IAA ketika dalam media penumbuhan ditambahkan Tryptophan. Indikasi awal ini memberi gambaran, bahwa kemungkinan RPTT dengan aktivitas produksi IAA tinggi cenderung 'non inducible' atau bersifat konsekutif.

Isolat-isolat yang mampu menghasilkan IAA digunakan untuk memfermentasi bahan-bahan organik yang mudah didapat di masyarakat seperti kecambah (taoge), tepung ikan dan bahan organik lainnya (Antonius dan Agustiyani 2012) dijadikan pupuk organik hayati (POH). Beberapa kriteria penting yang terkait kualitas POH adalah berapa lama daya tahan terhadap penyimpanan. Mengingat POH merupakan inovasi antara nutrisi organik atau penyubur tanaman dan agen hayati (Antonius dan Agustiyani 2012), maka keberadaan zat hormon tumbuh IAA menjadi bagian yang sangat penting.

Kestabilan kualitas selama produksi dan penyimpanan POH menjadi salah satu parameter yang sangat penting. Seperti ditampilkan pada Gambar 5, merupakan pemantuan yang masih berlangsung, sebagai konfirmasi ulang dari kandungan IAA dalam POH, apakah *replicable* dan stabil sehingga dapat dilanjutkan dalam proses industri pada skala besar. Dari hasil monitoring ulang (masih terus berlangsung) dapat diketahui bahwa adanya kemiripan hasil dengan data sebelumnya yaitu ketika disimpan selama sekitar 3 bulan kandungan IAA-nya berkisar 8-9 ppm. Pada Tabel 1 ditampilkan data hasil analisa kandungan IAA sampel POH yang disimpan selama 1 tahun (Agustyani et al. 2012) . Pada POH yang disimpan relatif lebih singkat kandungan IAA-nya masih rendah dan kemudian meningkat sejalan lamanya penyimpanan. Data yang demikian semakin mempertegas bahwa IAA disekresikan oleh agen hayati POH pada saat-saat ketika kondisi lingkungan tumbuh sudah kurang mendukung atau semakin berkurang kandungan nutrisinya bagi agen hayati POH tersebut. Ada kemungkinan IAA dihasilkan/disekresikan pada masa-masa istirahat, seperti layaknya pada produksi metabolit sekunder.



Gambar 4. Produksi IAA beberapa isolat dengan penambahan *L-Tryptophan* dan tanpa penambahan *L-Tryptophan*



Gambar 5. Kandungan IAA selama proses penyimpanan POH

Tabel 1. Kandungan IAA pada produk POH Startmik-LIPI setelah penyimpanan.

No	Penyimpanan POH (Bulan)	Konsentrasi IAA (ppm)
1	12	18,768
2	6	55,523
3	3	9,737
4	0.5	3,006
5	0	2,893

Agustiyan et al., 2012.

KESIMPULAN

Agen pupuk hayati rizobakteri pemacu tumbuh tanaman (RPTT) atau lazim disebut dengan *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR) penghasil IAA dengan aktivitas yang tinggi ditemukan dari berbagai ekosistem dan yang paling tinggi adalah pada tanah limbah tandan pisang. Tiap-tiap jenis RPTT menunjukkan reaksi yang berbeda dalam memproduksi IAA ketika ditambahkan prekursor tryptophan. Peningkatan kandungan IAA selama penyimpan pupuk organik hayati (POH) adalah *replicable* sehingga memungkinkan untuk diproduksi dalam skala besar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Atas kerjasama dan bantuan team laboran dan teknisi (A Angraeni, Ari, E. Sutisna, N Mulyani, laboratorium pupuk organik hayati-LIPI, penulis mengucapkan banyak terima kasih. Penelitian ini dapat terlaksana berkat pendanaan dari Program Prioritas Nasional Pengembangan Pupuk Organik Hayati Mikroba Indonesia Tahun 2009-2014 dan Penelitian Kompetitif LIPI.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiyan D, Dewi TK, Anggraeni A dan Antonius S. 2012. Pembuatan starter, pemeliharaan mikroba dalam starter, pemantauan viabilitas dan aktivitas mikroba dalam pupuk organik hayati cair sebagai upaya mempertahankan kualitas. *Prosiding Seminar Nasional Biologi 2012*, Universitas Negeri Semarang, pp. 416-424
- Antonius S, Laili N, Imamuddin N and Agustiyan D. 2012. Development of Sustainable Agriculture: The Role of Beyonic-StarTmik LIPI Biofertilizer on Yield Improvement of Various Crops and Conservation of Soil Biochemical Properties of various Ecosystem in Indonesia. In Abdulhadi, R., Tjahjono, B.S.E., Waluyo, E.B., Delinom, R.M., Priyono, S.N., Fizzanty, T., Lesmana, T. (eds). Proceedings "Mobilizing Science Toward Green Economy", The 12 th Sciences Council os Asia (SCA) Conference and International Symposisum 10-12 July, 2012-Bogor, Indonesia. pp. 119-126.
- Antonius S dan D Agustyani. 2011. Pengaruh pupuk organik hayati yang mengandung mikroba bermanfaat terhadap pertumbuhan dan hasil panen tanaman semangka serta sifat biokimia tanahnya pada percobaan lapangan di Malinau-Kalimantan Timur. *Berk. Penel.Hayati*. 16: 203–206.
- Bolero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassan F and Luna V. 2007. Phytohormone production by three strains of Bradyrhizobium japonicum and possible physiological and technological implications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 : pp. 874-880.
- Glickmann E and Dessaux Y. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2):793.
- Gordon SA and Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid, *Plant Physiol.*, 26, 192-195
- Gravel V, Antoun H and Tweddel RJ. 2007. Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants, *Eur J. Plant. Pathol.*, 119 : 457-462
- Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemicsresistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp., *Phytopathology*, 94 : 1259-1266.
- Kovacs K. 2009. Applications of Mossbauer spectroscopy in plant physiology, *PhD Theses*, ELTE Chemistry Doctoral School, ELTE Institute of Chemistry, Budapest.
- Lee S, Flores-Encarnaclon M, Contreras-Zentalla M, Garcia-Flores L, Escamilla JE and Kennedy C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrom c biogenesis genes, *J. Bacteriol.*, 186 (16) : pp. 5384-5391.
- Mehnaz S and Lazarovits G. 2007. Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions, *Microbial Ecology*, Vol 51, 326-335
- Patil NB, Gajbhiye M, Ahiwale SS, Gunjal AB and Kapadnis BP. 2011. Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane, *J. of Environ. Sci.*, Vol 2, No.1.
- Spaepen S, Vanderleyden J and Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria, *Adv. Bot. Res.*, 51 : 283-320.
- Van Loon LC. 2007. Plant responses to plant growth-promoting-rhizobacteria, *Eur J. Plant. Pathol.*, 119:243-254.
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant Soil*, 255: 571-586.