

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pertanian modern saat ini sangat bergantung pada penggunaan bahan-bahan kimia diantaranya pupuk sintetis, fungisida dan pestisida yang justru dapat mengakibatkan tekanan pada lingkungan. Produk-produk bioteknologi mulai dikembangkan untuk memecahkan masalah tersebut, salah satu diantaranya adalah pengembangan mikroorganisme endofit penghasil fitohormon indole acetic acid (IAA) yang dapat memacu pertumbuhan tanaman.

Mikroorganisme endofit dapat diisolasi dari beberapa bagian tanaman seperti akar, batang, daun, biji. Mikroorganisme ini dapat ditumbuhkan pada skala laboratorium dan ditingkatkan potensinya dalam menghasilkan hormon IAA melalui manipulasi lingkungan, khususnya media tumbuh.

Produksi hormon IAA oleh mikroorganisme pada skala laboratorium memerlukan media tumbuh yang memenuhi syarat dari segi nutrisi, yaitu tercukupi sumber C, N dan asupan triptofan sebagai prekursor dalam sintesis IAA. Limbah pengolahan tahu merupakan limbah organik dengan kandungan C dan N yang cukup tinggi, sehingga dapat mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Triptofan banyak tersedia pada pupuk kandang yang mudah diperoleh dan dengan kadar yang cukup tinggi.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka perlu dikaji tentang potensi mikroba endofitik dari akar tanaman jagung dalam penghasilan hormon IAA secara invitro pada medium limbah pengolahan tahu yang disuplementasi dengan triptofan pupuk kandang.

B. Rumusan Masalah

Pengetahuan mengenai bakteri endofit masih sangat sedikit, baik dari jenis maupun kegunaannya, terutama mikroba endofit yang memiliki potensi untuk menghasilkan hormon tumbuh IAA. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa akar tanaman jagung dapat berasosiasi dengan bakteri endofit, khususnya bakteri endofit penghasil IAA. Namun belum dikembangkan potensinya dalam penghasilan hormon IAA secara invitro. Disisi lain, kebutuhan akan pupuk hayati yang ramah lingkungan saat ini semakin meningkat, sehingga perlu dicari upaya untuk pengembangan pupuk hayati. Permasalahan yang timbul dalam penelitian adalah :

1. Apakah terdapat mikroba endofit pada beberapa varietas akar tanaman jagung yang mampu menghasilkan hormon IAA
2. Bagaimana kemampuan bakteri endofit menghasilkan hormone IAA pada medium limbah pengolahan tahu suplementasi triptofan pupuk kandang
3. Bagaimana pengaruh hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri endofit secara invitro terhadap perkecambahan jagung

C. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan mikroba endofit pada perakaran jagung yang memiliki kemampuan menghasilkan hormon IAA
2. Mengetahui kemampuan penghasilan hormon IAA secara invitro melalui manipulasi media tumbuh
3. Mengetahui pengaruhnya terhadap perkecambahan tanaman jagung

D. Urgensi Penelitian

Pertanian modern saat ini sangat bergantung pada penggunaan bahan-bahan kimia diantaranya pupuk sintetis, fungisida dan pestisida. Bahan-bahan kimia tersebut baik disadari maupun tidak telah mengakibatkan tekanan pada lingkungan. Kesadaran akan dampak negatif dari penggunaan bahan-bahan kimia tersebut, ditunjang dengan adanya perkembangan di bidang bioteknologi, telah mendorong berkembangnya produk-produk alternatif yang ramah lingkungan, termasuk di dalamnya produk mikroba penghasil senyawa yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman (fitohormon), salah satunya adalah Indole Acetic Acid (IAA).

Hormon IAA merupakan fitohormon golongan auksin alami dan berperan sebagai zat pemacu pertumbuhan tanaman. Hormon IAA merupakan hormon kunci bagi beberapa aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam lingkungan, tumbuhan tidak memiliki kemampuan yang cukup dalam mensintesis hormon endogenous untuk memacu pertumbuhannya agar lebih optimal. Tanaman memenuhi kebutuhan akan hormon tumbuh melalui kemampuannya dalam mensintesis hormon auksin dari mikroorganisme yang berada dalam jaringannya. Mikroorganisme khususnya Bakteri penghasil IAA mempunyai potensi untuk bergabung dengan beberapa proses fisiologis tanaman dengan cara memasukkan IAA yang dihasilkannya ke tanaman. Mikroorganisme yang mampu melakukan simbiotik dengan tanaman inang didalam jaringan tanaman disebut sebagai mikroba endofit.

Mikroorganisme endofit merupakan mikroorganisme yg berasosiasi dengan jaringan atau sel tanaman tingkat tinggi dan tidak memberikan kerugian pada tanaman tersebut. Bakteri endofit dapat diisolasi dari permukaan benih, akar, batang, daun dan biji yang telah steril. Salah satu penelitian oleh Gustin Khairani, 2009, berhasil mengisolasi 13 isolat bakteri endofit penghasil IAA pada akar tanaman jagung dengan kadar IAA tertinggi 1,1255 ppm. Penelitian lain melaporkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* mampu merangsang pertumbuhan akar jagung pada hidroponik dengan menghasilkan IAA. Spesies dari genus *Pseudomonas* lainnya yaitu *Pseudomonas putida* juga dilaporkan mampu mempercepat pertumbuhan tanaman. Hasil penelitian terhadap kapang endofit menunjukkan bahwa bagian tanaman yang berbeda dari satu tanaman inang memperlihatkan isolat kapang endofit yang berbeda. Demikian juga halnya perbedaan habitat dan ekosistem tanaman inang menunjukkan perbedaan kapang endofit.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan mikroba endofit dari akar tanaman beberapa varietas jagung yang berada di wilayah Gorontalo yang memiliki potensi untuk menghasilkan hormon IAA. Isolat yang mempunyai kemampuan tertinggi dalam menghasilkan hormon IAA kemudian diinduksi dengan penambahan triptofan sebagai prekursor dalam medium limbah pengolahan tahu untuk meningkatkan kemampuannya dalam menghasilkan hormon IAA. Limbah pengolahan tahu merupakan limbah organik yang mengandung karbon dan protein yang cukup tinggi. Kandungan karbon dan nitrogen yang tinggi pada limbah dapat digunakan oleh mikroba penghasil

hormon IAA sebagai substrat pertumbuhan sehingga meningkatkan nilai tambah limbah tersebut. Hormon IAA yang dihasilkan dalam medium limbah pengolahan tahu dengan suplementasi oleh triptofan dapat diaplikasikan untuk merangsang pertumbuhan tanaman tingkat tinggi maupun tingkat rendah. Sebagaimana hasil penelitian oleh Kristianti Indah Purwani tahun 2008, yang mengaplikasikan hormon tumbuh auksin (IAA) pada alga *Chlorella* sp dan perlakuan auksin dengan konsentrasi 65 ppm mampu meningkatkan laju pertumbuhan relatif sebesar 1,522 hari-1 dengan kepadatan sel rata-rata 2.100.000 sel/ml.

Biosintesis IAA oleh mikroba secara invitro dapat ditingkatkan dengan penambahan triptofan eksogenus sebagai prekursor (Arshad et al. dalam Arkhipchenko, 2004). Penelitian Gusnaniar (2007) membuktikan bahwa bakteri tanah *Rhizobium* sp. mampu memproduksi IAA tertinggi sebesar 51,08 µg/mL dengan menambahkan asam amino L-triptofan sebagai prekursor. Karena tingginya harga triptofan komersial, diperlukan eksplorasi sumber triptofan alami yang tersedia dalam jumlah banyak dan mudah diperoleh, serta relatif murah. Salah satu sumber triptofan yang ekonomis ialah pupuk kandang. Menurut Arkhipchenko et al. (2006), limbah kotoran ayam mengandung triptofan sebesar 460,1±5,9 Hg/g. Sebagaimana hasil penelitian Kresnawaty dkk tahun 2008, tentang kemampuan produksi IAA

oleh *Rhizobium* sp pada medium serum Latex pekat suplementasi triptofan pupuk kandang menghasilkan hormon IAA tertinggi pada inkubasi 48 jam dengan hasil 7,42 $\mu\text{g/mL}$.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Mikroba Endofit

Mikroorganisme endofit merupakan mikroorganisme yang selama siklus hidupnya berada dalam jaringan tanaman dan dapat membentuk koloni tanpa menimbulkan kerusakan pada tanaman tersebut (Strobel et al, 2003 dalam Khairani, 2009). Mikroorganisme endofit tersebut merupakan mikroorganisme yang dapat diekstrak dari bagian tanaman atau diisolasi dari permukaan jaringan tanaman. Mikroorganisme endofit termasuk mikroorganisme yang menguntungkan yang tidak memiliki pengaruh langsung pada tanaman, dan mikroorganisme yang dapat digunakan sebagai biological control bagi tanaman patogen atau untuk memacu pertumbuhan tanaman (Tarabily at al, 2003 dalam Kairani, 2009).

Radji, 2005 menyatakan bahwa mikroorganisme endofit dapat menjadi sumber berbagai metabolit sekunder baru yang berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang medis, pertanian, dan industri. Kemampuan mikroorganisme endofit dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk membantu kemajuan teknologi di pertanian dalam hal pupuk sintetis yang ramah lingkungan. Beberapa mikroba endofit dapat menghasilkan hormon yang dapat merangsang pertumbuhan tanaman. Salah satu hormon yang dihasilkan oleh mikroba endofit adalah IAA (Indole Acetic Acid).

Peranan mikroba endofit dalam memacu pertumbuhan tanaman telah banyak mendapat perhatian sehingga mikroorganisme endofit dapat

dimanipulasi untuk meningkatkan produktivitas tanaman jagung (Tahabily et al, 2003 dalam Khairani, 2009). Pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan antara lain adalah lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, dapat diproduksi dalam skala besar, dan kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda.

Penelitian tentang peran mikroba endofit dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman inang melalui penghasilan hormon IAA sudah banyak dikaji, terutama beberapa strain pada perakaran tanaman gandum mampu menghasilkan hormon IAA yang menstimulus pertumbuhan tanaman tersebut (Etesani et al, 2009). *Bradyrhizobium japonicum* juga mampu merangsang pertumbuhan kedelai (*Glycine max*) melalui penghasilan IAA (Als Egebo, et al, 1991).

Kresnawaty (2008) melaporkan bahwa hormon IAA dapat dihasilkan secara in vitro oleh mikroorganisme endofit khususnya *Rhizobium* sp, melalui pemanfaatan media tumbuh berupa serum latex dengan suplementasi triptofan dari pupuk kandang. Sedangkan pada penelitian Khairani (2009) berhasil mengisolasi 13 bakteri endofit perakaran jagung yang mampu menghasilkan hormon IAA dengan 3 isolat diketahui paling efektif dalam produksi IAA.

B. Hormon IAA dan Biosintesisnya

Indole Acetic Acid (IAA) merupakan salah satu jenis hormon yang dapat memacu pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan proses elongasi sel dan

perpanjangan batang seperti halnya diferensiasi sel (Taraby et al, 2003). Mekanisme kerja IAA dalam mengatur perkembangan dan pertumbuhan lewat pengaruhnya terhadap dinding sel, permeabilitas membran sel, penyerapan zat hara, metabolisme karbohidrat dan proses respirasi (Agustrina & Santosa, 1988).

IAA juga dapat meningkatkan sintesis DNA dan RNA, serta meningkatkan pertukaran proton (Aslamsyah, 2002 dalam Kresnawaty, 2008), dengan cara meningkatkan aktivitas transkripsi DNA untuk membentuk template atau dengan mempengaruhi efektifitas RNA Polymerase (Kresnawaty & Santosa, 1988). Salisbury & Ross (1995) menyatakan bahwa pada kecambah monokotil, IAA yang banyak terdapat pada ujung koleoptil dan semakin berkurang ke arah akar. Mekanisme kerja IAA dalam perpanjangan sel adalah IAA mendorong elongasi sel-sel pada koleoptil dan ruas-ruas tanaman.

IAA secara alami dihasilkan oleh tanaman khususnya pada sistem perakaran. Dalam lingkungan, tumbuhan tidak memiliki kemampuan yang cukup dalam mensintesis hormon endogenous untuk memacu pertumbuhannya agar lebih optimal. Tanaman memenuhi kebutuhan akan hormon tumbuh melalui kemampuannya dalam mensintesis hormon auksin dari mikroorganisme yang berada dalam jaringannya. Mikroorganisme khususnya Bakteri penghasil IAA mempunyai potensi untuk bergabung dengan beberapa proses fisiologis tanaman dengan cara memasukkan IAA yang dihasilkannya ke tanaman.

Biosintesis IAA oleh tanaman maupun mikroorganisme endofit memerlukan precursor berupa tryptophan (L-trp). Penelitian dr Gusnaniar (2007) membuktikan bahwa bakteri tanah memproduksi IAA tertinggi adalah *Rhizobium* sp. sebesar 51,08 mikrogram/ml dengan menambahkan asam amino L-triptofan sebagai precursor.

Eksudat akar merupakan sumber utama triptofan di lingkungan tanah. Sebagaimana hasil penelitian Kravchenko et al (1994) menyatakan bahwa kadar triptofan yang dihasilkan pada sistem perakaran padi sebesar 8,3 sampai 390 ng perhari. Hal tersebut didukung oleh penelitian Sarwer and Frankenberger (1994) yang membandingkan pertumbuhan tanaman jagung pada variasi konsentrasi IAA dengan hasil bahwa pertumbuhan tanaman jagung meningkat pada konsentrasi triptofan rendah dan akan menurun dengan meningkatnya konsentrasi.

Kelompok bakteri sistem perakaran yang mampu mensintesis IAA diantaranya *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Xanthomonas* dan kelompok *Pseudomonas* (Manulis et al, 1998). Biosintesis IAA pada prokariotik dapat menggunakan beberapa lintasan metabolisme yang didasarkan hasil antara dari metabolisme tersebut, meliputi Indole-3-acetamide (IAM), indole-3-pyruvate (IPyA), tryptamine dan indole-3-acetonitrile. Dua jalur utama yang umum terjadi pada bakteri adalah IAM dan IPyA. Proses biosintesis IAA dibantu oleh enzim IAA oksidase. Siklus konversi tryptofan ke IAA melibatkan deaminasi, dekarboksilasi dan reaksi hidrolisis.

C. Limbah Cair Industri Tahu

Limbah industri tahu terdiri dari dua jenis, yaitu limbah cair dan limbah padat. Dari kedua jenis limbah tersebut, limbah cair merupakan bagian terbesar dan berpotensi mencemari lingkungan. Sebagian besar limbah cair yang dihasilkan bersumber dari cairan kental yang terpisah dari gumpalan tahu pada tahap proses penggumpalan dan penyaringan yang disebut air dadih atau whey. Sumber limbah cair berasal dari proses sortasi dan pembersihan, pengupasan kulit, pencucian, penyaringan, pencucian peralatan proses dan lantai.

Limbah cair industri tahu mengandung bahan-bahan organik kompleks yang tinggi terutama protein dan asam-asam amino dalam bentuk padatan terlarut dan tersuspensi. Adanya senyawa-senyawa organik tersebut menyebabkan limbah cair industri tahu mengandung BOD, COD dan TSS yang tinggi yang apabila dibuang ke lingkungan tanpa pengolahan dapat menyebabkan pencemaran.

Limbah cair tahu merupakan salah satu limbah yang dapat dimanfaatkan kembali untuk menghasilkan produk. Salah satunya melalui fermentasi secara anaerob untuk menghasilkan asam-asam organik sebagai produknya. Sebagaimana hasil penelitian Darsono, 2007, dengan menggunakan limbah cair tahu sebagai substrat pada proses fermentasi dengan pembentukan produk (product yield) sebesar 1,7237 dengan hasil fermentasi berupa asam asetat sebesar 15,1376%. Disamping itu penelitian dari Nisa dkk, 1997, tentang pemanfaatan limbah pabrik tahu sebagai bahan

pembuatan nata, dengan hasil tebal nata 6,0 mm dan berat 23,0 gram setelah inkubasi 14 hari.

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif yang menggambarkan kemampuan bakteri endofit akar tanaman jagung dalam penghasiian hormone IAA secara invitro pada media limbah cair industri tahu suplementasi triptofan pupuk kandang dan kemampuan dalam menginduksi perkecambahan tanaman jagung.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan yang digunakan dalam penelitian : akar tanaman jagung umur 3- 5 minggu varietas motoro dan Bisi II, alkohol, natrium hipoklorit, hormone IAA sintetis, pupuk kandang, limbah cair tahu, medium Nutrient Agar (NA), medium Nutrient Broth (NB), tryptofan, NaOH, Cu^{2+} , Zn^{2+} , asam trikloro asetat (TCA) 10%.
2. Alat yang digunakan : oven, inkubator, autoclave, Erlenmeyer, mikropipet, tabung reaksi, spektrofotometer, sentrifuge, shaker incubator, colony counter, mikroskop.

C. Teknik Pengumpulan Data

1. Isolasi Mikroba Endofit dari akar tanaman jagung

Teknik isolasi meikroba endofit pada perakaran jagung didasarkan pada metode Radu & Kqeen, tahun 2002.

Akar tanaman jagung varietas Motoro dan Bisi II dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan akar. Akar dikeringkan dan dibawa ke laboratorium mikrobiologi FMIPA UNG.

Tahap awal isolasi adalah mencuci sebagian akar tanaman dengan air mengalir selama 20 menit, kemudian disterilisasi bagian permukaan tanaman dengan merendamnya secara berturut-turut dalam larutan etanol 75% selama 2 menit, larutan sodium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, larutan etanol 75% selama 30 detik. Selanjutnya akar dicuci dengan akuades steril sebanyak 2 kali dan dikeringkan dengan kertas saring steril. Akar dipotong menjadi 4 bagian masing masing berukuran 1 cm, dan diletakkan pada permukaan media NA dengan posisi bekas potongan ke arah media. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang ($25 - 30^{\circ}\text{C}$) selama 24 – 48 jam. Koloni yang tumbuh pada media NA disubkulturkan pada media NA baru sampai diperoleh isolat murni. Isolat murni yang diperoleh dikarakterisasi morfologinya dengan pewarnaan gram.

2. Pengukuran pertumbuhan bakteri endofit

Pengukuran pertumbuhan sel dilakukan dengan metode standart plate count. Pengukuran pertumbuhan diamati setiap 2 hari sekali yaitu pada masa inkubasi hari ke-0, ke-2, ke-4 dan ke-6. Suspensi mikroba sebanyak 1 ml diencerkan sampai tahap pengemceran 10^{-7} , kemudian diinokulasikan pada media plate count agar dengan metode pour plate dan diinkubasi selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan colony counter. Perhitungan estimasi jumlah sel dapat dihitung dengan rumus :

Estimasi jumlah sel = jumlah koloni x 1/faktor pengenceran (CFU/ml)

3. Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi bakteri penghasil IAA didasarkan pada sifat-sifat morfologi koloni, bentuk sel dan hasil pewarnaan bakteri menggunakan pewarnaan gram.

4. Kemampuan bakteri endofit akar dalam menghasilkan IAA secara invitro.

Untuk mengetahui kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan IAA secara invitro, pertama-tama bakteri diremajakan dalam medium NA dan diinkubasi selama 48 jam. Kemudian isolat dibuat suspensi sebanyak 10 ml dengan standard Mc Farland sehingga diperoleh suspensi bakteri dengan kerapatan sel 10^8 CFU/ml. Suspensi biakan bakteri diambil sebanyak 3 ml dan dimasukkan kedalam media Luria Bertani (LB) cair + tryptofan. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari dalam shaker inkubator kecepatan 150 rpm. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 25 menit, diperoleh supernatan dan pelet. Analisis kadar IAA dengan menggunakan metode kolorimetri. Supernatan diambil sebanyak 2 ml ditambah salkowsky reagent sebanyak 1 ml atau dengan perbandingan 2:1. Didiamkan selama 60 menit dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

5. Penentuan kurva standard IAA (Aryanta et al, 2004 dalam Khairani, 2009)

IAA sintesis ditimbang sebanyak 0,001 gram dan dilarutkan kedalam 100 ml aquades. IAA sintesis kemudian masing-masing dibagi kedalam tabung yang berbeda dengan konsentrasi 0 ppm, 0,2 ppm sampai 2 ppm. Setiap

tabung yang berisi konsentrasi IAA yang berbeda ditambahkan akuades hingga mencapai volume 3 ml. masing-masing konsentrasi ditambahkan pereaksi Salkowski kemudian dihomogenkan dan absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

6. Uji Introduksi bakteri endofit pada kecambah tanaman jagung

Bakteri yang diintroduksi adalah bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan IAA tertinggi. Kecambah tanaman jagung umur 3 hari disterilkan dengan cara direndam dalam larutan sodium hipoklorit 5,3% selama 1 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 5 detik, dan dibilas dengan akuades sebanyak 2 kali (Khairani, 2009). Kecambah tanaman dicelupkan kedalam suspensi bakteri endofit yang telah setara dengan mc Farland 10^8 CFU/ml selama 2 jam. Kecambah ditanam pada tanah steril, kecambah yang tidak dicelupkan digunakan sebagai kontrol, dan dilakukan 3 kali ulangan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu dengan mengukur tinggi kecambah, panjang akar kecambah, dan berat kecambah. Pengukuran tinggi kecambah dilakukan dengan batas ternawah bagian batang yang tepat pada permukaan tanah, dan batas teratas dihitung hingga ujung daun yang diluruskan ke atas sejajar batang.

7. Produksi IAA pada medium limbah cair industri tahu

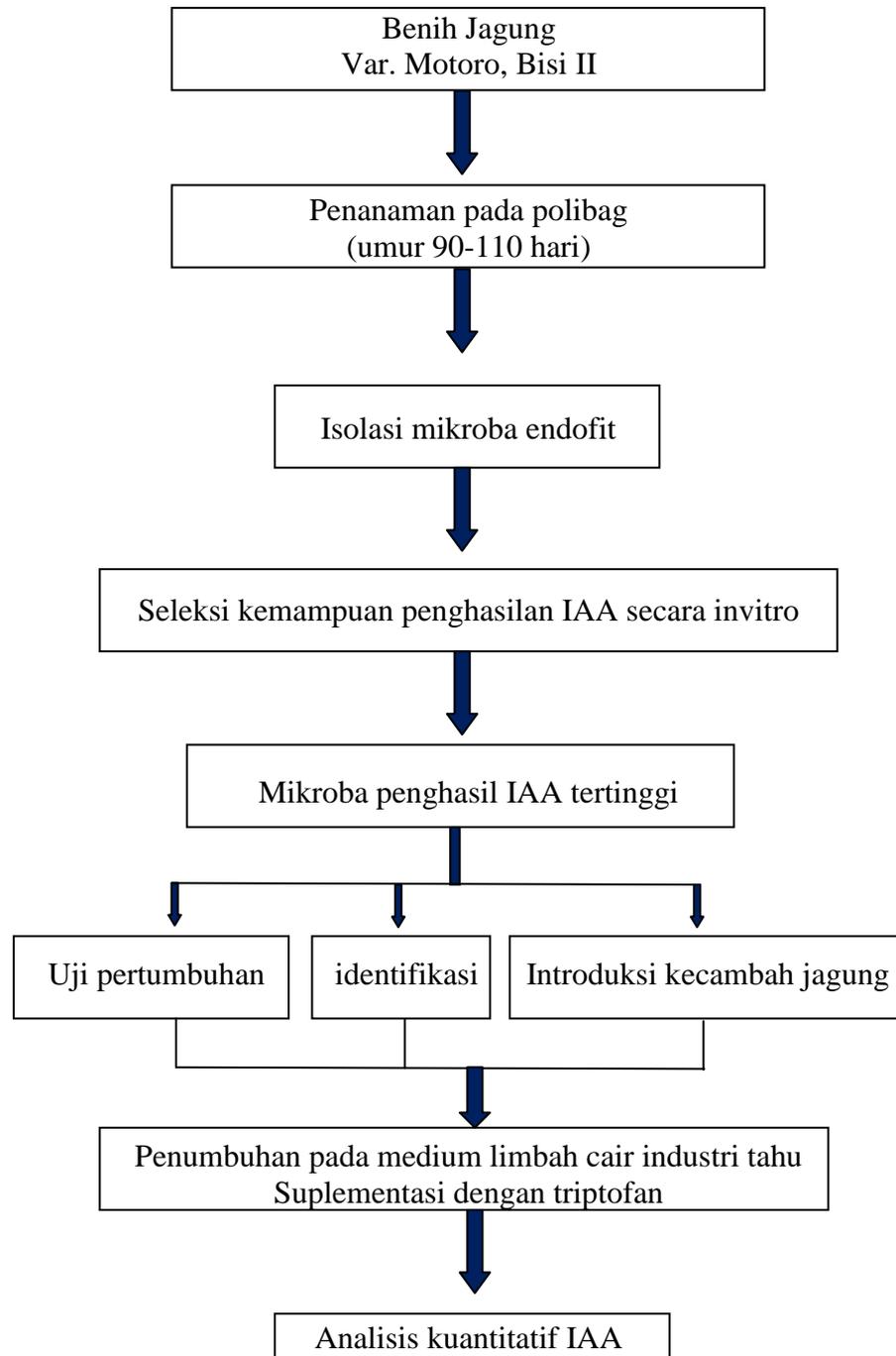
Triptofan sebagai prekursor IAA diperoleh dari hidrolisis protein pupuk kandang menggunakan basa kuat. Hidrolisis dilakukan secara tidak Langsung (Kresnawaty dkk, 2008) dengan cara mereaksikan sebanyak 75

gr pupuk kandang ditambah 100 ml air dan 8 gram NaOH dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 4 jam lalu disaring. Filtrat digunakan untuk medium pertumbuhan bakteri dengan dicampurkan kedalam 500 ml limbah cair industri tahu. Medium tumbuh ditambahkan 0,5 ml Cu^{2+} dan Zn^{2+} 0,05 mM untuk stimulasi biosintesis IAA. pH di ukur dan dinetralkan hingga mencapai kisaran 6,3 – 6,4 dan ditepatkan hingga 1 liter dan disterilisasi pada outoklave pada suhu 121°C. Kedalam medium kemudian dimasukkan suspensi inokulum bakteri sebanyak 5% v/v dan digoyang di atas shaker pada suhu 27 – 30°C.

8. Analisis kuantitatif dan Identifikasi IAA

Produksi IAA diukur secara spektrofotometri pada jam ke-24, 48, dan 72 jam. Sebanyak 5 mL sampel masing-masing medium ditambahkan asam trikloro asetat (TCA) 10% untuk menjernihkan larutan dan dibiarkan beberapa menit. Sebanyak masing-masing 1 mL supernatan hasil pengendapan digunakan untuk pengukuran konsentrasi IAA. Analisis spektrofotometri dilakukan dengan metode Salkowski (Fletcher & Saul, 1963). Sebanyak 2 mL suspensi dalam medium fermentasi diambil lalu disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatannya sebanyak 1 mL ditambah 2 mL pereaksi Salkowski. Larutan lalu ditambah akuades hingga volumenya 6 mL, dihomogenkan dengan vortex, didiamkan selama 30 menit untuk pengembangan warna, kemudian diukur absorbannya pada panjang gelombang 530 nm. Serapan IAA dibaca dengan mengurangi nilai

absorban sampel yang ditambah reagen Salkowski dengan nilai densitas optik sebelumnya.



Gambar 1 : Bagan skema kerja

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

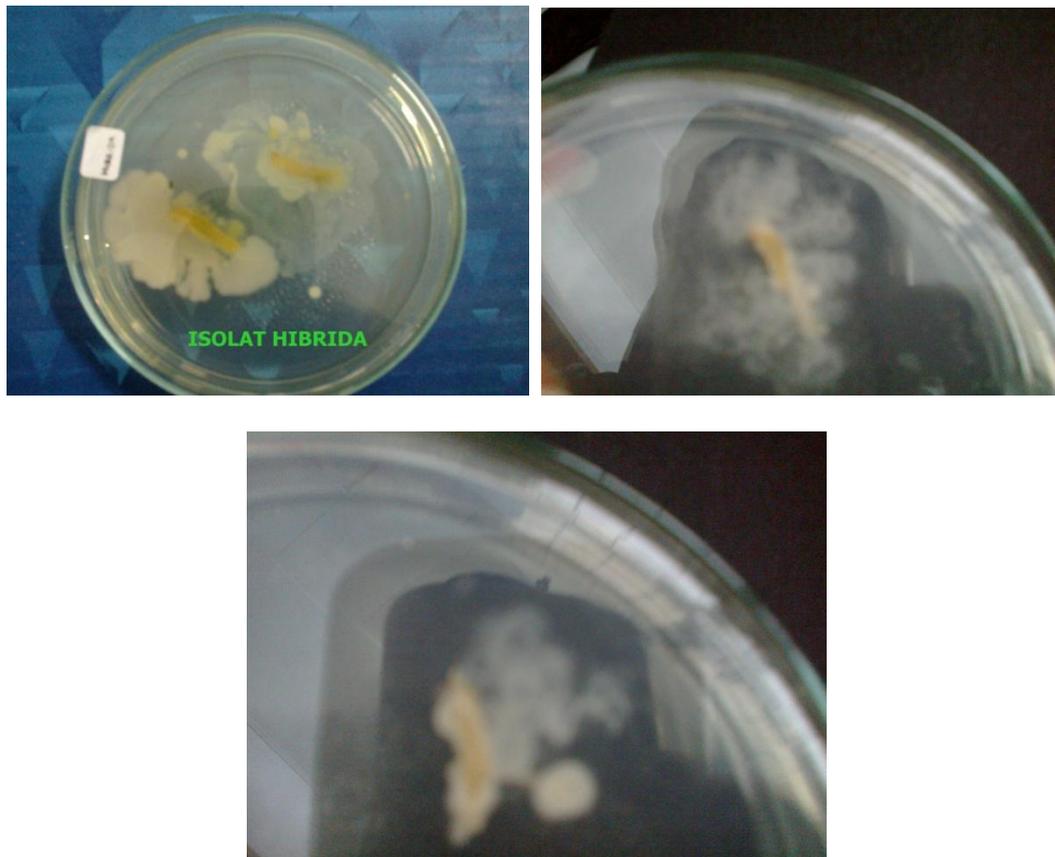
1. Isolasi dan Karakterisasi Mikroba Endofit dari akar tanaman jagung

Isolasi bakteri endofit dari akar tanaman jagung varietas motoro dan Bisi II diperoleh 8 isolat (Tabel, gambar). Sebanyak 3 isolat diperoleh dari varietas Motoro dan 3 isolat dari varietas Bisi II. Jenis bakteri endofit yang diperoleh relatif sedikit, hal tersebut dikarenakan umur tanaman jagung yaitu berkisar 4 – 6 minggu, seperti halnya dikatakan Khairani (2008), bahwa semakin tua umur tanaman jagung, maka jenis bakteri endofit semakin banyak.

Keenam isolat tersebut menunjukkan karakteristik yang bervariasi baik morfologi maupun sifat pewarnaannya. Bentuk koloni isolat didominasi oleh irregular (tidak beraturan) dan berwarna putih selebihnya berbentuk rhizoid (akar). Sedangkan karakterisasi dengan pewarnaan gram sel bakteri dengan menggunakan zat warna kristal violet dan safranin, diperoleh semua isolat bersifat gram negatif, tidak ditemukan isolat bersifat gram positif. Hasil pengamatan morfologi koloni dan sel dengan pewarnaan ditunjukkan pada gambar 2.

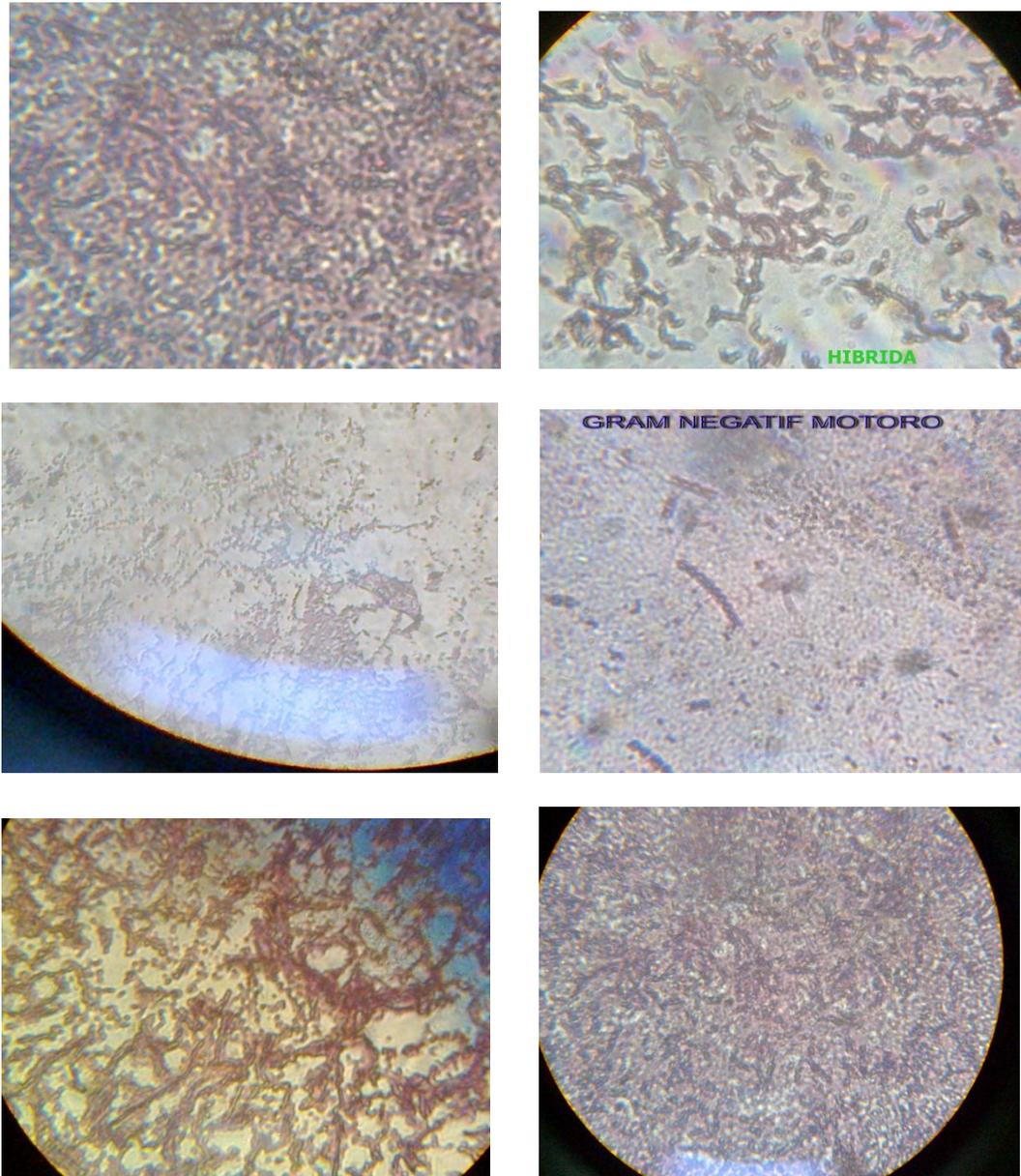
Tabel 1: Karakteristik bakteri endofit akar tanaman jagung (*Zea mays*)

| Isolat | Karakterisasi | | | | | |
|--------|------------------|-------------|-------|------|---------------|------------|
| | Morfologi koloni | | | Gram | Morfologi Sel | |
| | Bentuk | Tepi | Warna | | Bentuk | Penataan |
| H1 | irreguler | cembung | Putih | Ngtf | Kokus | Uniseluler |
| H3 | irregular | Rata | Putih | Ngtf | Kokus | Uniselular |
| H4 | Rhizoid | filamentous | Putih | Ngtf | Batang pendel | Uniselular |
| M2 | Irregular | Rata | Putih | Ngtf | kokus | Berantai |
| M2B | Bulat | Cembung | Putih | Ngtf | Batang pendek | Uniselular |
| M2C | Irregular | Rata | Putih | Ngtf | kokus | Uniselular |



Gambar 2 : Morfologi Koloni Bakteri endofit akar tanaman Jagung

Hasil pengamatan terhadap bentuk sel bakteri diperoleh 1 isolat berbentuk kokus yang tersusun sebagai rantai atau istilah umumnya streptococcus, sedangkan isolat lain berbentuk coccus dan batang pendek (gambar 3).



Gambar 3: Bentuk sel bakteri endofit akar tanaman jagung dengan pewarnaan gram

2. Pertumbuhan Mikroba Endofit

Hasil pengukuran terhadap pertumbuhan keenam bakteri endofit diperoleh bahwa isolat keenam isolat menunjukkan pertumbuhan yang cepat. Hal tersebut ditunjukkan dengan banyaknya jumlah koloni selama waktu inkubasi.

Tabel 2 : Pertumbuhan bakteri endofitik

| Isolat | Jumlah Sel bakteri (CFU/ml) | | | |
|--------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Hari ke 0 (10 ⁴) | Hari ke 2 (10 ¹²) | Hari ke 4 (10 ¹⁵) | Hari ke 6 (10 ¹⁶) |
| H1 | 8,52 | 5,23 | 8,24 | 9,55 |
| H3 | 8,14 | 5,12 | 8,72 | 9,23 |
| H4 | 7,98 | 4,96 | 8,95 | 9,75 |
| M2 | 7,25 | 3,56 | 7,35 | 8,34 |
| M2B | 6,98 | 3,24 | 7,21 | 8,23 |
| M2C | 7,61 | 1,12 | 8,31 | 9,81 |

3. Kemampuan bakteri endofit akar dalam menghasilkan IAA secara invitro.

Hasil pengukuran kadar IAA secara invitro dari bakteri menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar IAA yang dihasilkan oleh masing-masing isolat setelah inkubasi selama 7 hari. Kadar IAA ditunjukkan oleh besaran penyerapan cahaya yang diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 530nm. Kadar IAA yang dihasilkan pada inkubasi hari ketiga rata-rata masih relatif rendah dan meningkat setelah inkubasi pada hari ketujuh (tabel 2).

Tabel 2 menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki kemampuan yang berbeda dalam penghasilan hormon IAA. Produksi tertinggi dihasilkan oleh isolat M2B yang diisolasi dari jagung varietas Mоторo. Namun bila dilihat secara keseluruhan, isolat yang diisolasi dari akar jagung varietas Bisi II lebih mampu menghasilkan IAA yang lebih besar daripada isolat dari varietas Mоторo.

Tabel 3 : Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan hormon IAA secara invitro

| Isolat | Nilai OD pada $\lambda 530\text{nm}$ | |
|--------|--------------------------------------|-----------|
| | Hari ke-3 | Hari ke-6 |
| H1 | 0,462 | 0,749 |
| H3 | 0,841 | 2,33 |
| H4 | 0,365 | 2.009 |
| M2 | 0,295 | 0.43 |
| M2B | 0,431 | 2,691 |
| M2C | 0,494 | 0,646 |

4. Produksi IAA oleh Mikroba Endofit pada medium limbah cair industri tahu suplementasi triptofan dari pupuk kandang

Hasil pengukuran terhadap penghasilan hormon IAA oleh mikroba endofit yang ditumbuhkan pada medium limbah cair tahu dengan suplementasi triptofan dari pupuk kandang diperoleh bahwa kemampuan penghasilan rata-rata meningkat walaupun tidak signifikan pada semua isolat dan kemampuan tertinggi diperoleh pada masa inkubasi 48 jam dan menurun setelah masa inkubasi diperpanjang sampai pada inkubasi 72 jam. Dari keenam isolat yang memiliki kemampuan tertinggi adalah isolat H4 yang diperoleh dari akar jagung hibrida. Hasil pengukuran ditunjukkan pada tabel 4.

Tabel 4 : Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan hormon IAA selama pertumbuhan pada medium limbah cair tahu suplementasi dengan triptofan pupuk kandang.

| Isolat | Nilai OD pada $\lambda 530\text{nm}$ | | |
|--------|--------------------------------------|--------|--------|
| | 24 jam | 48 jam | 72 jam |
| H1 | 0,1205 | 0,134 | 0,1155 |
| H3 | 0,1145 | 0,1185 | 0,1085 |
| H4 | 0,1335 | 0,1395 | 0,1195 |
| M | 0,124 | 0,130 | 0,1075 |
| M2B | 0,1165 | 0,126 | 0,1175 |
| M2C | 0,1235 | 0,1315 | 0,1155 |

5. Uji Introduksi bakteri endofit pada kecambah tanaman jagung

Hasil pengujian pengaruh mikroba endofit pada pertumbuhan tanaman jagung dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji introduksi bakteri endofit pada kecambah tanaman jagung

| Isolat | Tinggi Batang | Panjang Akar |
|-----------|---------------|--------------|
| H1 | 18,6 | 10,73 |
| H3 | 18,23 | 9,5 |
| H4 | 17,8 | 10,73 |
| Kntrol H | 7,5 | 14,23 |
| M | 11,43 | 11,2 |
| M2B | 12,27 | 13,73 |
| M2C | 10,83 | 11,24 |
| Kontrol M | 8,7 | 9,0 |

Tabel 5 menunjukkan bahwa masing-masing isolat memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pertumbuhan tanaman jagung selama dua minggu masa tanam. Pertumbuhan tanaman jagung yang diintroduksi dengan bakteri endofit yang diisolasi dari akar varietas motoro menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan isolat yang lain. Khususnya perlakuan dengan isolat M2B menunjukkan pertumbuhan yang paling baik dibandingkan perlakuan dengan isolat lainnya.

B. Pembahasan

Akar tanaman jagung varietas Motoro dan Bisi II mengandung bakteri endofit dalam jumlah dan jenis yang relatif sedikit. Hal tersebut salah satunya dipengaruhi oleh umur tanaman yang relatif muda yaitu 4 – 6 minggu. Khairani menyatakan bahwa semakin tua umur tanaman, maka bakteri endofit akan semakin banyak.

Masing-masing bakteri endofit menunjukkan karakteristik yang spesifik yang menunjukkan sebagai jenis yang berbeda. Karakterisasi berdasar sifat morfologi koloni dan morfologi sel merupakan langkah awal dalam tahap identifikasi bakteri. Berdasarkan hasil karakterisasi maka akan diketahui bahwa isolat yang berhasil diisolasi dari akar tanaman jagung merupakan jenis yang berbeda.

Bakteri endofit merupakan bakteri yang mempunyai kemampuan untuk berasosiasi dengan tanaman khususnya pada jaringan tanaman dan tidak mempengaruhi aktivitas fisiologi tanaman yang menjadi inangnya. Bahkan pada dasarnya keberadaan mikroba endofit dalam jaringan suatu tanaman justru menguntungkan bagi tanaman tersebut. Salah satunya adalah bakteri endofit penghasil hormon tumbuh IAA, yang berasosiasi pada akar tanaman. Keberadaan mikroba endofit penghasil IAA di dalam jaringan akar tanaman dapat membantu pertumbuhan tanaman inang melalui penghasilan hormon yang merangsang pertumbuhan tanaman.

Pengujian terhadap kemampuan bakteri dalam menghasilkan hormon IAA secara invitro dalam medium tumbuh yang disuplementasi dengan triptofan sebagai prekursor biosintesis IAA sangat penting untuk mengetahui dan mengidentifikasi jenis bakteri yang mempunyai kemampuan menghasilkan hormon IAA terbesar diantara isolat bakteri endofit yang lain. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa isolat bakteri endofit pada akar tanaman jagung menghasilkan hormon IAA dalam kadar yang berbeda. Hal tersebut dipengaruhi

oleh sifat fisiologi masing-masing bakteri dimana setiap bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mengkonversi triptofan menjadi IAA.

Produksi IAA secara invitro oleh masing-masing isolat lebih banyak dihasilkan setelah inkubasi hari ketujuh dibandingkan hari ketiga. Atau dengan kata lain bahwa produksi IAA berbanding lurus dengan lama waktu inkubasi, yaitu semakin lama waktu inkubasi produksi IAA semakin meningkat. Hal tersebut dipengaruhi oleh faktor kecukupan nutrient selama masa pertumbuhan bakteri dan adanya suplai triptofan murni sebagai prekursor sintesis IAA.

Pada uji penghasiian hormon tumbuh IAA secara invitro oleh bakteri endofit menunjukkan fenomena bahwa terdapat bakteri yang pada inkubasi hari ketiga mampu menghasilkan hormon paling tinggi diantara isolat yang lain, tetapi produksinya menjadi lebih lambat pada inkubasi hari ketujuh. Hal tersebut diduga karena isolat tersebut juga menggunakan hormon IAA yang dihasilkannya untuk bermetabolisme. Menurut Lestari dkk (2007) bahwa pada awal inkubasi sumber nutrisi tinggi sehingga produksi IAA tinggi dan terus meningkat meskipun tidak secara signifikan namun konsisten sampai akhir inkubasi. Pada bakteri terdapat fenomena bahwa pola produksi dan konsumsi IAA berjalan seimbang. Misalnya *Azospirillum* masih mampu memproduksi IAA dan secara simultan bakteri juga mengkonsumsi IAA untuk pertumbuhannya meskipun medium pertumbuhan sudah miskin nutrisi.

Kemampuan produksi IAA isolat bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman jagung varietas Bisi II pada dasarnya lebih besar dibandingkan isolat dari varietas Motoro. Hal tersebut dipengaruhi oleh sifat fisiologi bakteri itu sendiri

dan juga dipengaruhi oleh sifat fisiologi tanaman inangnya. Seperti halnya diketahui bahwa pertumbuhan bakteri endofit didalam jaringan inang sangat dipengaruhi oleh sifat fisiologi tanaman inangnya. Bakteri endofit dalam pertumbuhannya sangat tergantung dari suplai nutrient dari tanaman inang dan bakteri tersebut akan memberikan kontribusi positif bagi tanaman melalui kemampuannya dalam menghasilkan hormon tumbuh IAA disamping juga dihasilkan sendiri oleh tanaman itu sendiri.

Pertumbuhan bakteri sangat memerlukan asupan nutrient yang mendukung pertumbuhannya, khususnya makromolekul protein, karbohidrat. Makromolekul tersebut tersedia didalam media tumbuh, sebagai contoh limbah tahu. Limbah industri tahu merupakan bahan sisa buangan dari produksi tahu yang masih kaya akan karbohidrat dan protein. Penggunaan limbah industri tau diharapkan dapat sebagai media tumbuh mikroba khususnya mikroba endofit dalam hubungannya dengan penghasilan IAA secara invitro. Produksi IAA secara invitro memerlukan suplai asam amino triptofan sebagai prekursor dalam biosintesis IAA, yang dalam hal ini tersedia dalam pupuk kandang dengan perlakuan tertentu. Seperti halnya hasil penelitian Kresnawaty dkk (2008) menyatakan bahwa pupuk kandang merupakan sumber triptofan yang besar dan dapat dimurnikan dengan metode hidrolisis. Hasil penelitian pada produksi IAA dengan menggunakan triptofan dari pupuk kandang menghasilkan IAA yang lebih rendah dibandingkan triptofan sintetis, hal ini disebabkan karena triptofan yang dihasilkan dari hidrolisis kotoran ayam memiliki kadar dan tingkat kemurnian yang masih rendah. Disamping itu kemungkinan juga dipengaruhi oleh medium tumbuh, dimana medium tumbuh

pada uji invitro menggunakan medium tumbuh umum Nutriet Broth yang mengandung gula dan protein sederhana yang mudah dimetabolisme oleh bakteri, sedangkan limbah industri tahu masih mengandung karbohidrat dan protein kompleks. Hal tersebut berpengaruh terhadap aktivitas metabolisme sel bakteri yang berpengaruh terhadap produksi akhir IAA.

Produksi IAA oleh bakteri endofit pada medium limbah cair tahu tertinggi dicapai pada inkubasi 48 jam dan menurun setelah inkubasi 72 jam. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Gusniar (2007) dan Kresnawaty (2008) yang menyatakan produksi IAA tertinggi dicapai pada inkubasi selama 48 jam. Pada periode inkubasi 48 jam bakteri pada umumnya memasuki fase akhir logaritmik, sehingga IAA yang dihasilkan cukup tinggi. Hal tersebut dipengaruhi oleh karena kandungan enzim-enzim yang digunakan dalam biokonversi triptofan menjadi IAA seperti triptofan monooksigenase, IAM hidrolase, indol-piruvat dekarboksilase dan IAA1d dehidrogenase dihasilkan cukup banyak dan aktif sejalan dengan laju pertumbuhan. Sementara pada inkubasi 24 jam produksi IAA masih rendah, hal tersebut disebabkan karena pada masa inkubasi tersebut bakteri masih dalam fase logaritmik dan juga enzim-enzim untuk mengubah triptofan menjadi IAA masih rendah. Pada inkubasi 72 jam bakteri memasuki fase kematian sehingga produksi IAA menurun. Menurut Bhattacharyya dan Basu dalam Kresnawaty (2008) menyatakan bahwa penurunan produksi IAA pada 72 jam karena adanya pelepasan enzim pendegradasi IAA seperti oksidase dan peroksidase.

Isolasi bakteri penghasil IAA dari akar tanaman jagung diharapkan dapat dijadikan sebagai pupuk hayati yang dapat diaplikasikan dalam bidang pertanian. Hal tersebut diuji melalui uji introduksi mikroba endofit pada kecambah tanaman jagung. Perlakuan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan mikroba endofit terhadap pertumbuhan jagung selama masa tanam 2 minggu. Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi pengaruh yang diberikan oleh masing-masing isolat bakteri. Pertumbuhan tanaman jagung yang diintroduksi dengan mikroba endofit pada tanaman jagung varietas motoro dan Bisi II lebih baik dibandingkan kontrol tanpa introduksi mikroba. Hal tersebut menunjukkan bahwa mikroba berperan aktif dalam mendukung pertumbuhan tanaman jagung melalui asosiasi di dalam akar tanaman dan menghasilkan IAA yang merupakan hormon tumbuh tanaman. Asosiasi bakteri ke akar kecambah jagung mempengaruhi kemampuan sekresi IAA oleh tanaman menjadi lebih tinggi. IAA yang dihasilkan oleh isolat memberikan dampak pada morfologi akar, khususnya panjang akar yang menyebabkan perluasan serapan hara sehingga berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman yang ditunjukkan dengan penambahan panjang batang tanaman.

Bakteri penghasil IAA berpotensi bergabung dengan beberapa proses fisiologis tanaman dengan cara memasukkan IAA yang diasilkannya ke tanaman. Hal tersebut berpengaruh pada tanaman menjadi lebih sensitif dalam mengubah konsentrasi yang dimilikinya sehingga membantu dalam pembentukan akar lateral dan akar adventif serta elongasi akar primer (Leveau & Lindow, 2004 dalam Khairani 2010). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Patten & Glick, 2002

dalam Khairani 2010, peningkatan pertumbuhan akar tanaman merupakan salah satu tanda utama yang dapat diamati apabila tanaman tersebut telah dinokulasi oleh bakteri endofit.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan, maka kesimpulan dari penelitian ini adalah :

1. Terdapat enam isolat bakteri endofit pada akar tanaman jagung varietas Motoro dan Bisi II yang mampu menghasilkan hormon IAA
2. Bakteri endofit akar tanaman jagung yang ditumbuhkan pada medium limbah cair tahu dengan suplementasi triptofan dari pupuk kandang mampu menghasilkan IAA dengan kemampuan tertinggi dicapai pada inkubasi 48 jam.
3. Bakteri endofit dari akar tanaman jagung mampu mempercepat pertumbuhan kecambah jagung selama dua minggu masa tanam.

B. SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mikroba endofit pada tanaman jagung meliputi batang dan daun dan analisa potensinya dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman jagung.

DAFTAR PUSTAKA

- Etesami H, H.A Alikhani, and A.A Akbari, 2009, Evaluation of plant hormones production (IAA) ability by iranian soils rhizobial strains and effect of superior strains application on wheat growth indexes. *World Applied Sciences Journal* 6(11): 1576-1584.
- Als Egebo L, S.V.S Nielsen, and B.U. Jochimsen. 1991. Oxigen-Dependent catabolisms of indole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. Aug. 1991. P. 4897 – 4901
- Manulis S, A.H Chesner, M.T Brandl, S.E Lindow and I. Barash. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *erwinia herbicola* pv. *Gypsophilae*. *MPMI* Vol. 11 no.7. pp. 634-642
- Kresnawaty I, S. Andanawarih, Suharyanto dan Tri-Panji. 2008. Opmimisasi dan pemurnian IAA yang dihasilkan *Rhizobium* sp. dalam medium serum lateks dengan suplementasi triptofan dari pupuk kandang. *Menara Perkebunan*. 76(2), 74-82
- Gusnaniar. 2007. Produksi IAA oleh *Rhizobium* sp, *Pseudomonas* spp, dan *Azotobacter* sp. dalam medium sintetik dan serum lateks *Hevea brasiliensis* Muel.Arg dengan suplementasi triptofan.
- Khairani G. 2009. Isolasi dan uji kemampuan bakteri endofit penghasil hormon IAA (Indole Acetic Acid) dari akar tanaman jagung (*Zea mays*). Skripsi. Biologi Department, FMIPA, Universitas Sumatera Utara.
- Salisbury F.B and C.W Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Bandung: Institit Teknologi Bandung Press.
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah ilmu kefarmasian*. 2(3): 113-126
- Radu S and C.Y Kqeen. 2002. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in malaysia for antimicroial and antitumor activity. *Malaysian journal of medicinal science*. 9(2): 23-33
- Aryantha I.N, D.P Lestari, N.P.D Pangesti. 2004. Potensi isolat bakteri penghasil IAA dalam peningkatan pertumbuhan kecambah kacang hijau pada kondisi hidroponik. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9(2): 43-46

- Agustrina R dan Santosa. 1988. Pengaruh pemberian IAA dan sulfur terhadap kandungan sulfat dan protein total pada *Allium cepa* var. *ascalonicum*(L) Bark. BPPS-UGN, 3(1): 465-473
- Darsono. 2007. Pengolahan limbah cair tahu secara anaerob dan aerob. url : http://fti.uajy.ac.id/wg-content/uploads/publicfiles/JurnalJanuari200702-Jornal%20limbah%20tahu_darsono.pdf
- Nisa F.C, H.R Halim, B.B Baskoro, T. Wastono dan Moestijanto. 1997. Pemanfaatn limbah cair tahu (whey) sebagai bahan pembuatan nata. Buletin penalaran mahasiswa UGM. Vol.3 No. 2: 39-44

Lampiran 1 : Tahap isolasi mikroba endofitik akar tanaman jagung

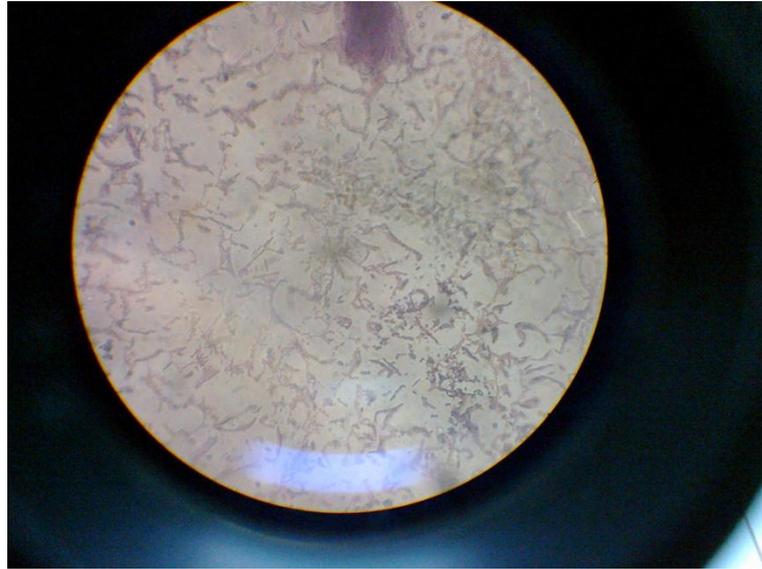






Lampiran 2 : Tahap pewarnaan gram

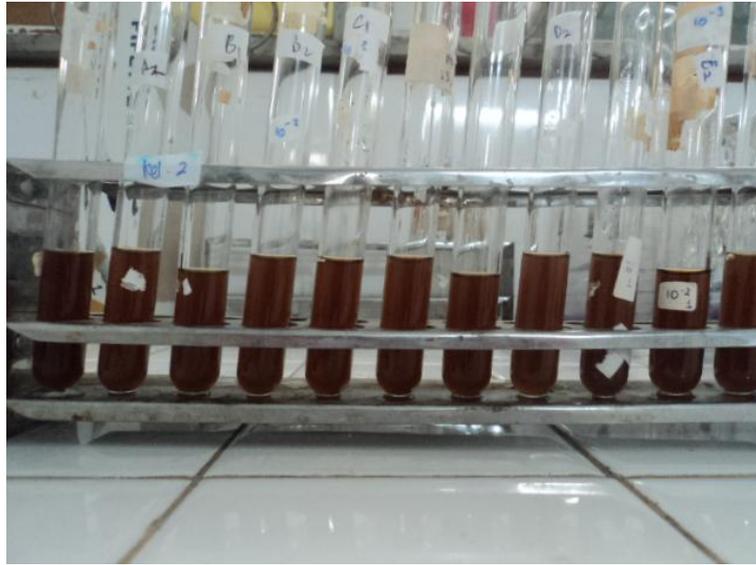




Lampiran 3 : Persiapan pengukuran kadar IAA pada medium limbah cair industri tahu suplementasi triptofan pupuk kandang menggunakan metode kolorimetri dengan menggunakan spektrofotometer







Lampiran 4 : Kecambah jagung varietas Bisi II dan Mоторo umur 3 hari



Lampiran 5 : Perendaman kecambah jagung pada sspensi bakteri endofit



Lampiran 6 : Pertumbuhan tanaman jagung yang diintroduksi dengan isolat bakteri endofit



Lampiran 7 : Pertumbuhan tanaman jagung setelah 2 minggu masa tanam dengan introduksi bakteri endofit

