

KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ASAM INDOL ASETAT DAN PENGARUHNYA TERHADAP VIGOR BENIH PADI [Characterization of Bacteria Producing Indole Acetic Acid and Its Effect on Rice Seed Vigor]

Puji Lestari ✉, Yadi Suryadi, Dwi Ningsih Susilowati, Tri Puji Priyatno, dan I Made Samudra
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A Bogor 16111
e-mail: plestari129@yahoo.com

ABSTRACT

The ability to produce indole acetic acid (IAA) by endophytic bacteria is one of the basic criteria for the use of bacteria as plant growth promoter agent which is essential for the agricultural production. The objectives of this study were to evaluate the ability of 17 bacterial isolates to produce IAA and its effect on improvement of rice seed germination and molecular identification of the selected isolates based on the 16S rRNA gene. The IAA content was determined using Salkowski method measured by spectrophotometer UV-Vis and the effect of endophytic bacteria inoculation on seed germination was done by *in vitro* assay. Sequences of the selected isolates 16S rRNA amplified by PCR were analyzed the homology against bacterial 16S rRNA database in Genebank. IAA values ranged from 6.632 to 50.053 mg/L with the highest IAA production shown by isolate 6KJ which was followed by 4PB (41.807 mg/L). Bacterial IAA increased rice seed vigor significantly compared to control. However, bacterial inoculation with different concentrations of IAA did not significantly affect the growth of rice plants. Based on the IAA and its effect on seed vigor, 6KJ, 4PB and 2KB were selected for molecular identification. Results showed that the three isolates belonged to *Bacillus* genus, 6KJ as *B. aryabhatai*, 4PB belonging to *B. cibi* and 2KB having 97% homology with *B. marisflavi*. Further evaluation of the selected endophytic isolates producing IAA is necessary to be carried out to explore their potency as a source of hormone to promote plant growth.

Key words: indole acetic acid, endophytic bacteria, rice, vigor.

ABSTRAK

Kemampuan untuk menghasilkan asam indol asetat (AIA) oleh bakteri endofit merupakan salah satu kriteria dasar untuk pemanfaatan bakteri sebagai agen pemacu pertumbuhan tanaman yang sangat penting untuk produksi pertanian. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kemampuan 17 isolat bakteri dalam menghasilkan AIA dan pengaruhnya terhadap peningkatan perkecambahan benih padi dan identifikasi molekuler bakteri terpilih berdasarkan gen 16S rRNA. Penentuan kandungan AIA menggunakan metode Salkowski yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis, dan pengaruh inokulasi bakteri endofit terhadap perkecambahan benih padi dilakukan secara *in vitro*. Sikuen hasil amplifikasi sikuen 16S rRNA melalui *polymerase chain reaction* (PCR) dianalisis homologinya terhadap *database* 16S rRNA bakteri di *genebank*. Nilai AIA yang dihasilkan semua isolat berkisar antara 6,632 sampai 50,053 mg/L dengan nilai tertinggi ditunjukkan oleh isolat 6KJ yang diikuti oleh 4PB (41,807 mg/L). Bakteri penghasil AIA meningkatkan vigor benih padi secara nyata dibandingkan dengan kontrol. Namun pemberian inokulan bakteri dengan konsentrasi AIA yang berbeda tidak secara nyata mempengaruhi pertumbuhan tanaman padi. Berdasarkan kandungan AIA dan pengaruhnya terhadap vigor benih, isolat 6KJ, 4PB dan 2KB dipilih untuk diidentifikasi molekuler. Hasilnya menunjukkan bahwa ketiga isolat termasuk dalam genus *Bacillus*, khususnya 6KJ sebagai *B. aryabhatai*, 4PB termasuk dalam *B. cibi* dan 2KB memiliki 97% homologi dengan *B. marisflavi*. Hasil studi ini merupakan informasi awal, sehingga evaluasi isolat bakteri endofit penghasil AIA terseleksi perlu dilanjutkan untuk menggali potensinya sebagai sumber hormon untuk memacu pertumbuhan tanaman.

Kata kunci: asam indol asetat, bakteri endofit, padi, vigor.

PENDAHULUAN

Pertanian modern saat ini sangat bergantung pada penggunaan bahan-bahan kimia seperti pupuk, fungisida dan pestisida untuk meningkatkan hasil panen. Penggunaan bahan-bahan kimia baik disadari maupun tidak telah mengakibatkan dampak negatif pada lingkungan, misalnya polusi pada aliran-aliran air dan sungai yang dapat mempengaruhi biota air. Populasi dan komposisi mikroorganisme dalam tanah yang bermanfaat

untuk pertanian dapat terganggu (Rajapaksha *et al.*, 2004; Manuel *et al.*, 2008). Kesadaran akan lingkungan yang sehat dan perkembangan di bidang bioteknologi, telah mendorong berkembangnya produk-produk alternatif yang ramah lingkungan, termasuk di dalamnya pupuk mikroba penghasil senyawa yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman.

Pertumbuhan tanaman sangat dipengaruhi oleh hormon pertumbuhan termasuk auksin yang

berperan penting dalam membantu pembentukan asam indol-3 asetat (AIA). AIA secara kimia mirip dengan asam amino triptofan dimana dianggap sebagai asal dari bentuk molekul AIA. Triptofan mengalami dekarboksilasi menjadi triptamin, yang kemudian dioksidasi dan deaminisasi menghasilkan indol asetaldehid. Molekul ini akan mengalami oksidasi lebih lanjut untuk menghasilkan asam indol asetat. AIA merupakan hormon kunci bagi berbagai aspek pertumbuhan tanaman yang dapat meregulasi banyak proses fisiologi, seperti pembelahan dan diferensiasi sel serta sintesa protein. Pada konsentrasi auksin optimum, sel-sel penyusun kambium aktif membelah dan terbentuk lapisan *xilem* yang cukup tinggi. AIA mendukung pemanjangan batang dengan meningkatkan pembesaran ukuran sel serta pembelahannya (Bialek, 1992; Bartel, 1997; Idris *et al.*, 2007).

Tumbuhan memiliki keterbatasan mensintesis AIA dalam mendukung pertumbuhan yang optimal. Oleh karena itu diperlukan tambahan hormon pemacu pertumbuhan dari luar yang bisa diberikan melalui pupuk maupun simbiosis mikroorganisme, diantaranya melalui bantuan bakteri endofit. Pada bakteri, produksi AIA melalui jalur *indole-3-pyruvic acid* (IpyA) telah diketahui. Langkah pertama jalur ini adalah konversi tryptophan ke IPyA oleh *aminotransferase* (transaminasi). Jalur IPyA adalah dekarboksilase untuk *indole-3-asetaldehyda* (IAAId) oleh *indole-3-piruvat dekarboksilase* (IPDC) (Minamisawa *et al.*, 1996). Pada langkah terakhir IAAId dioksidasi menjadi AIA (Spaepen *et al.*, 2007). Kemampuan memproduksi AIA oleh bakteri endofit merupakan dasar penggunaan bakteri tersebut sebagai bahan aktif sarana produksi pertanian seperti sebagai pupuk hayati dalam upaya untuk pertumbuhan tanaman ataupun biokontrol.

Beberapa mikroorganisme penghasil zat pengatur tumbuh berperan penting pada pertanian. Berbagai spesies mikroba tanah mampu menghasilkan AIA seperti *Azospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Klebsiella* sp.,

Alcaligenes faecalis, *Azoarcus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Cyanobacteria* dan bakteri sulfur dapat mendorong pertumbuhan tanaman (Rubio *et al.*, 2000). *Azospirillum* mempunyai kemampuan menambat nitrogen baik sebagai mikroorganisme yang hidup bebas atau berasosiasi dengan perakaran tanaman pangan seperti padi dan jagung. Beberapa strain bakteri dari genus *Azospirillum* memiliki kemampuan *phytostimulatory* (merangsang pertumbuhan tanaman). Hal ini disebabkan karena bakteri tersebut mampu memproduksi fitohormon, yaitu AIA (Lestari *et al.*, 2007). Bakteri endofit penghasil AIA yang berhasil diisolasi dari akar tanaman adalah *Agrobacterium tumefaciens* dan *Azotobacter vinelandii*. *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii* dan *A. paspali* mampu menghasilkan auksin. Bakteri tersebut dapat diisolasi dari akar padi. Identifikasi dengan menggunakan metode kalorimeter, *densitometry* dan *bioassay* dapat mengidentifikasi bakteri penghasil hormon AIA (Rubio *et al.*, 2000).

Dalam penelitian ini, isolat bakteri endofitik yang digunakan berasal dari koleksi penyimpanan jangka panjang bank gen mikroba Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) yang belum diidentifikasi maupun dikarakterisasi potensinya sebagai mikroba yang bermanfaat di bidang pertanian. Bakteri endofit yang diketahui sebagai penghasil AIA diisolasi dari beberapa daerah pertanian di Indonesia. Bakteri endofit yang diduga mampu menghasilkan AIA diharapkan akan membantu memacu pertumbuhan tanaman padi. Karena itu tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan 17 isolat bakteri dalam menghasilkan AIA serta pengaruhnya terhadap vigor benih dan pertumbuhan tanaman padi dalam kondisi terkontrol. Selanjutnya isolat terpilih berdasarkan kandungan AIA dan pengaruhnya terhadap vigor benih padi, diidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*).

BAHAN DAN CARA KERJA

Mikroba dan Peremajaan Isolat

Sebanyak 17 isolat bakteri dari beberapa daerah yang merupakan koleksi BB-Biogen dan varietas padi Inpari 13 diuji dalam penelitian ini. Peremajaan isolat bakteri endofitik dilakukan dengan menginokulasikan satu ose bakteri dari stok kultur ke dalam media Nutrient Agar miring dengan cara menggores *zigzag* secara aseptik, dan diinkubasi selama kurang lebih 2 hari pada suhu ruang. Kultur berumur 2 hari tersebut digunakan pada tahap selanjutnya untuk analisis AIA.

Analisis Asam Indol-3 Asetat (AIA) dengan Uji Salkowski

Untuk menentukan kadar AIA, sebanyak satu ose sel bakteri dari agar miring diinokulasi ke dalam 10 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung triptofan 2% dan diinkubasi selama 2 hari dengan agitasi 120 rpm. Kultur bakteri disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Pengukuran AIA berdasarkan reagen Salkowski (Glickmann dan Dessaux, 1994) sebanyak dua ulangan. Sebanyak 2 ml supernatan ditambahkan 4 ml pereaksi Salkowski, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi selama 1 jam. Larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2.800 pada panjang gelombang 530 nm dan menggunakan larutan AIA komersial (Sigma-Aldrich)

Inokulan disiapkan dengan mengkulturkan isolat bakteri dalam 10 mL media *Nutrient Broth* selama dua hari dengan agitasi 130 rpm. Benih padi varietas Inpari 13 dipilih yang sehat dan seragam, lalu dibersihkan dengan akuades steril sebanyak empat kali. Sebanyak 50 biji benih padi direndam dalam cawan petri yang berisi inokulan tiap isolat dan diinkubasi pada suhu ruang selama satu malam. Benih dipindahkan ke dalam petri berisi kertas saring yang sudah disterilkan sebelumnya, diinkubasi pada suhu ruang dengan dijaga kelembabannya. Pengamatan dilakukan dua

minggu setelah tanam terhadap panjang akar, panjang tunas dan bobot kering untuk mengetahui biomasanya. Vigor tanaman diukur dengan formula berdasarkan Abdul Baki dan Anderson (1973) sebagai berikut:

Vigor padi = (panjang akar + panjang tunas) x % benih berkecambah.

Data yang diperoleh dianalisis perbedaannya dengan metode Duncan menggunakan SAS ver 6.12 (NCSU, USA).

Isolasi DNA

Sebanyak tiga isolat terseleksi berdasarkan kadar AIA diidentifikasi secara molekuler. Isolasi DNA dilakukan mengikuti metode Lazo *et al.* (1987). Sebanyak ± 5 mL kultur sel bakteri umur 2 hari ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* disentrifugasi (10 menit, 8.000 rpm). Pelet yang dihasilkan dicuci dengan 1 mL buffer STE (*Sodium-Tris-EDTA*) dengan diresuspensi menggunakan mikropipet. Hasil resuspensi kembali disentrifugasi (10 menit, 8.000 rpm). Pelet dicuci dengan 200 µl bufer STE dan ditambahkan dengan 40 µL larutan SDS (*sodium dodecyl sulfate*) 10%. Suspensi diinkubasi dalam penangas air 65°C selama 90 menit, setelah dingin suspensi ditambahkan 4 µL proteinase-K 10 mg/mL. Suspensi DNA diinkubasi pada suhu 37°C selama paling sedikit 4 jam, kemudian secara perlahan ditambahkan fenol dan kloroform masing-masing 120 µL sampai terbentuk emulsi dan dicampur perlahan. Suspensi yang telah teremulsi disentrifugasi (15 menit, 8.000 rpm), supernatan yang mengandung DNA diambil, dipresipitasi dengan etanol absolut 95% dingin (-20°C) sebanyak 2 kali volume supernatan lalu diinkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit. DNA yang diperoleh dikeringudarkan, kemudian dilarutkan dengan 40 µL TE. DNA dilihat kuantitas dan kualitasnya dengan alat NanoDrop®2000 (Thermo Scientific, USA).

Amplifikasi dan Sekuensing

Amplifikasi menggunakan primer universal

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') (Marchesi *et al.*, 1998). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dalam volume 25 μ L dengan komposisi: 50 ng/ μ L DNA 2 μ L, 10X buffer, 1,25 μ L Taq DNA polimerase (RBC), 1 μ L primer 27F dan 1 μ L primer 1492R. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR (Swift Maxi Thermal Cycler). Reaksi PCR terdiri dari denaturasi awal pada 94°C selama 2 menit, diikuti 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C, 30 detik dan polimerasi pada 72°C, 1 menit. Perpanjangan final dilakukan pada 72°C selama 7 menit. Produk hasil PCR dielektroforesis di gel agarosa 1%, direndam dalam *ethidium bromide* dan divisualisasi pada UV transluminator dan 1 KB ladder digunakan sebagai marka pembanding. Produk PCR dalam bentuk pita tunggal dipurifikasi dengan etanol, dan disekuensing pada mesin sequencer ABI PRISM 3070 di perusahaan "1stBase" (Singapura). Sikuen nukleotida dianalisis homologinya menggunakan BLASTN di NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) di *database* 16S rRNA untuk bakteri and *Archaea*. Pohon filogenetik juga dibuat menggunakan sikuen ketiga isolat terpilih dibandingkan dengan sikuen mikroba penghasil AIA dan strain dalam genus *Bacillus* di *database* (www.ncbi.nlm.nih.gov) yang mempunyai kekerabatan paling dekat dan terjauh dengan isolat yang diidentifikasi menggunakan ClustalW (www.ebi.ac.uk).

HASIL

Produksi AIA oleh Bakteri Endofit

Total 17 isolat bakteri endofit yang didapatkan dari beberapa daerah di Indonesia seperti Bali, Jember, Kuningan, Yogyakarta dan Makasar diuji kemampuannya dalam menghasilkan asam indolasetat (AIA). Konsentrasi AIA yang terbentuk ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning kemerahan hingga merah muda sebagai indikasi

reaksi indol oleh larutan Salkowaski. Semakin tinggi kepekatan warnanya maka semakin tinggi produksi AIA yang dihasilkan.

Kandungan AIA oleh beberapa isolat bakteri ditampilkan pada Tabel 1. Tanpa mempertimbangkan asal geografi isolat, bakteri yang diuji menunjukkan variasi produksi AIA dari 6,632 sampai 50,053 mg/L dalam kondisi adanya triptofan. Isolat yang memiliki kemampuan empat terbesar dalam menghasilkan AIA diketahui berasal dari Jember, Bali dan Kuningan. Isolat 6KJ, 4PB, 1PK dan 10J masing-masing mampu menghasilkan AIA sebesar 50,053, 41,807, 34,789, dan 27,684 mg/L. Sedangkan dua isolat dengan konsentrasi yang terkecil adalah 2K, dan 2KB, masing-masing memproduksi 6,632, dan 7,860 mg/L. Selanjutnya, enam isolat yang memiliki konsentrasi AIA kontras (6KJ, 4PB, 1PK, 10J, 2K dan 2KB) dipilih untuk diuji pengaruhnya terhadap perkecambahan benih padi.

Pengaruh AIA terhadap Vigor Benih Padi

Berdasarkan uji statistik, pemberian inokulan bakteri terpilih penghasil AIA menunjukkan perbedaan peningkatan vigor benih dan pertumbuhan tanaman padi secara nyata dibandingkan dengan kontrol. Keragaan pertumbuhan tanaman padi yang diinokulasi bakteri penghasil AIA ditampilkan pada Gambar 1. Namun demikian, kenaikan konsentrasi AIA tidak berbanding lurus dengan dengan peningkatan vigor benih. Sebagai contoh, isolat 6KJ penghasil AIA tertinggi memberikan vigor lebih rendah (vigor sebesar 431) dari pada isolat penghasil AIA terendah yaitu 2KB yang menghasilkan vigor paling tinggi sebesar 549 (Tabel 2). Isolat 2K, 1PK, dan 6KJ memberikan pengaruh pertumbuhan tanaman padi yang tidak berbeda nyata dengan kontrol dalam aspek berat kering akar, meskipun ada kecenderungan peningkatan pada perlakuan isolat daripada kontrol (Tabel 2).

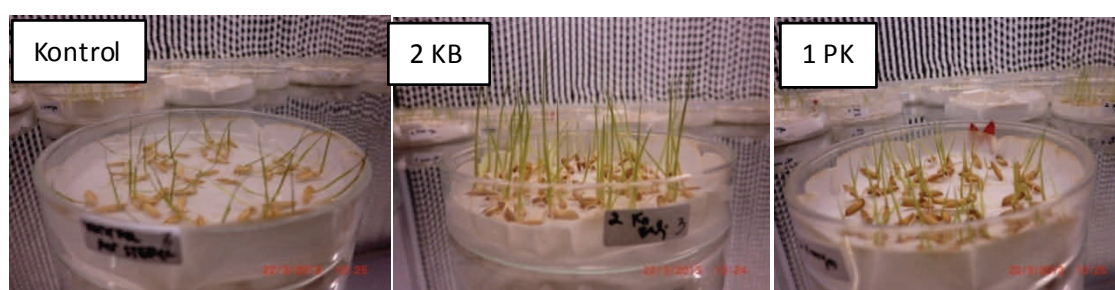
Tabel 1. Produksi AIA bakteri endofit setelah diinkubasi dua hari (*IAA production of endophytic bacteria after two days incubation*).

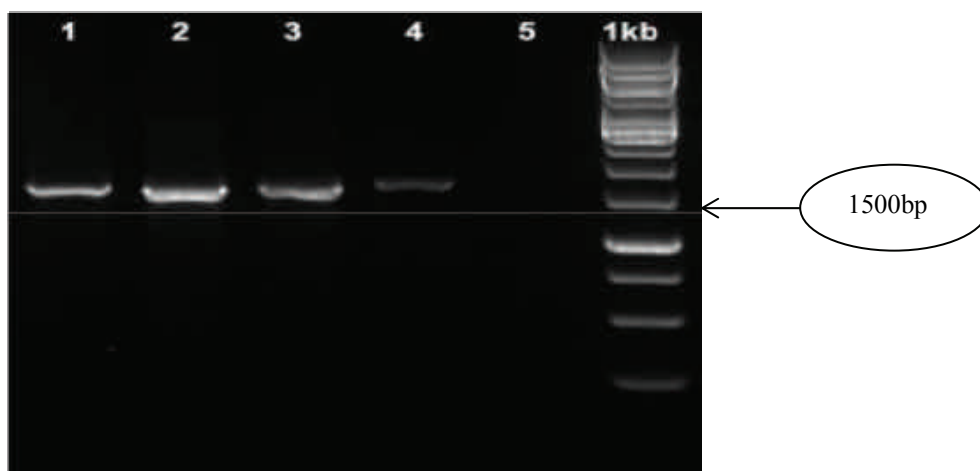
Isolat (<i>Isolates</i>)	Asal isolat (<i>Isolates origin</i>)	Konsentrasi AIA (<i>IAA concentration</i>) (mg/L)
4PB	Bali	41,807
4KB	Bali	9,088
9PB	Bali	11,105
13KrB	Bali	25,316
15PB	Bali	12,421
2PB	Bali	13,649
2KB	Bali	7,860
12PsB	Bali	24,263
6KJ	Jember, Jawa Timur	50,053
10J	Jember, Jawa Timur	27,684
11UJ	Jember, Jawa Timur	27,333
2K	Kuningan, Jawa Barat	6,632
5MK	Kuningan, Jawa Barat	11,632
1PK	Kuningan, Jawa Barat	34,789
2PiK	Yogyakarta, Jawa Tengah	17,509
6KY	Yogyakarta, Jawa Tengah	10,667
13KM	Makassar, Sulawesi	12,772

Tabel 2. Pengaruh bakteri penghasil AIA terhadap vigor benih padi dan bobot kering padi cv Inpari 13 (*The effect of bacteria producing IAA on rice vigor and dry weight of rice cv Inpari 13*).

Perlakuan (<i>Treatment</i>)	Rerata vigor padi (<i>Mean of rice vigor</i>)	Rerata bobot kering padi (<i>Mean of rice-dry weight</i>) (g)
2KB	549,00 ± 9,51a	1,1895±0,05
4PB	539,75± 12,62ab	1,1432± 0,08
2K	445,75 ± 7.48abc	1,1942±0,07
1PK	433,75±5.32abc	1,1492± 0,04
6KJ	431,00± 8.41abc	1,1728± 0,05
10J	355,25b±6.75c	1,1827±0,10
Kontrol (Air steril) [<i>Control (distilled water)</i>]	309,50±7.25c	1,1534± 0.09

Keterangan : Rataan selanjur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji selang ganda Duncan pada taraf 5% (*Means in column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at 5% level*).

**Gambar 1.** Pengaruh AIA pada pertumbuhan padi dan dibandingkan dengan kontrol (*Effect of IAA on rice growth and compared to control*).



Gambar 2. Elektroforesis gel agarosa 1% hasil amplifikasi gen 16S rRNA dari DNA isolat bakteri endofit terseleksi. *Ladder DNA (1 Kb ladder), isolat 6KJ(1), isolat 2KB (2), dan isolat 4PB (3) [1% agarose gel electrophoresis of 16S rRNA gene amplicons of the DNA from selected endophytic bacterial isolates. DNA ladder (1 Kb ladder), isolates of 6 KJ (1), 2KB (2), and 4 PB (3)].*

Identifikasi Molekuler dengan 16S rRNA

Berdasarkan kandungan AIA, diketahui bahwa isolat 6KJ dan 4PB superior dibandingkan isolat lainnya sedangkan 2KB meskipun kandungan AIA-nya rendah namun menunjukkan pengaruh tinggi terhadap vigor benih padi. Karena itu tiga isolat terpilih dari Jember dan Bali tersebut (6KJ, 2KB dan 5PB) diidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNANYa menggunakan sepasang primer. Amplikon 16S rRNA ketiga isolat tersebut dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil sikuensing menggunakan primer universal M13 menunjukkan bahwa ukuran fragmen 16S rRNA yang diperoleh pada isolat DNA 6KJ sebesar 1.406 bp, 2KB sekitar 1.437 bp, dan 4PB sebesar 1.438 bp.

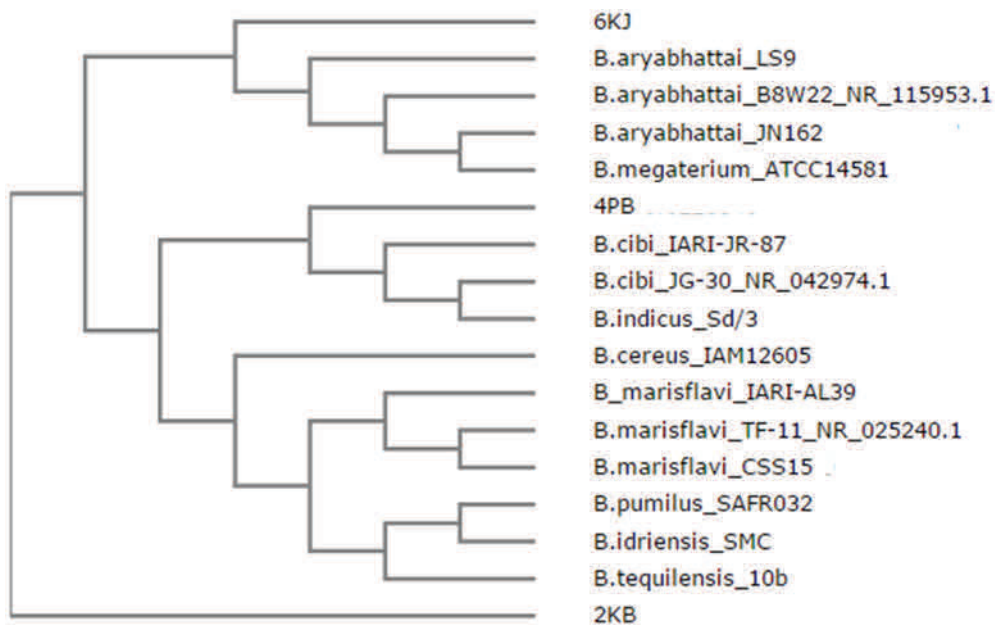
Analisis homologi sikuen tiga isolat terpilih penghasil AIA berhasil mengidentifikasi spesies bakteri menggunakan sistem BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) di database 16S rRNA bakteri melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Tabel 3). Gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi awal taksonomi bakteri dan analisis

filogeninya, yang merupakan salah satu jenis ribosomal RNA (rRNA) prokariot seperti yang ditunjukkan dalam penelitian ini. Ketiga isolat termasuk dalam genus *Bacillus* dengan kemiripan minimal 97% dengan sikuen 16S rRNA di *database*. Isolat 6KJ dan 4PB memiliki homologi 97% masing-masing dengan *B. aryabhatai* dan *B. cibi*, sedangkan 2KB teridentifikasi sebagai *B. marisflavi* dengan homologi 97%.

Analisis filogeni berdasarkan gen 16S rRNA mampu mengklasifikasi dalam dua garis silsilah taksonomi utama. Isolat 6KJ dan 4PB berada dalam kelompok strain spesies dalam *Bacillus*. 6KJ berada dalam satu sub-klaster dengan beberapa strain *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*. Di lain pihak 4PB cenderung dekat dengan *B. cibi* dan *B. indicus*. Sedangkan 2KB meskipun mempunyai homologi tinggi dengan *B. marisflavi* namun cenderung berbeda klaster. Perbandingan sikuen 16S RNA tersebut menunjukkan keragaman genetik yang cukup tinggi dari isolat bakteri endofit penghasil AIA.

Tabel 3. Analisis homologi sikuen 16S rRNA dari tiga isolat terpilih dengan sistem BLAST (*Homology analysis of 16S rRNA sequences from three selected isolates using BLAST system*).

Isolat <i>Isolates</i>	Species bakteri <i>(Bacterial species)</i>	Tingkat kemiripan dengan nomor kode aksesinya <i>(Similarity level with other accessions code)</i>	Nilai E <i>(E-value)</i>	Homologi <i>(Homology)</i> (%)
6KJ	<i>Bacillus aryabhatai</i>	NR_115953.1	0	97
4PB	<i>Bacillus cibi</i>	NR_042974.11	0	97
2KB	<i>Bacillus marisflavi</i>	NR_025240.1	0	96

**Gambar 3.** Dendrogram isolat bakteri endofit penghasil AIA terpilih (6KJ, 2KB dan 4PB) yang dibandingkan dengan strain bakteri dari spesies *Bacillus* di database berdasarkan sikuen 16S rRNA menggunakan analisis *neighbor joining* (*Dendrogram of selected endophytic bacterial isolates-producing IAA (6KJ, 2KB and 4PB) compared with other bacterial strains of Bacillus species in database based on the 16S rRNA sequences using neighbor joining analysis*).

PEMBAHASAN

Mengingat produksi AIA oleh bakteri endofit penting dalam membantu pertumbuhan tanaman, sehingga studi ini dilakukan. Berdasarkan kisaran kandungan AIA total 17 isolat yang dikarakterisasi, produksi AIA oleh isolat bakteri endofit dalam studi ini lebih tinggi daripada hasil laporan Ahmad *et al.* (2005) yang berkisar 7,3 - 32,8 mg/L dalam penambahan triptofan. Sebaliknya produksi AIA oleh mikroba biasanya rendah tanpa triptofan

(Maslahat dan Suharyanto, 2005; Ahmad *et al.*, 2005; Widiastuti *et al.*, 2010). Peningkatan konsentrasi triptofan mungkin dikarenakan adanya peningkatan secara nyata produksi AIA oleh mikroba endofit *Pseudomonas aeruginosa* AK2 (Karnwal, 2009). Hal ini dapat dimengerti mengingat triptofan merupakan prekursor dalam pembentukan senyawa AIA (Wright *et al.*, 1991).

Kemampuan kecepatan sintesis AIA bakteri mempunyai variasi cukup besar. Tidak hanya

mikroba endofit seperti dalam studi ini, namun juga banyak mikroba rizosfer diketahui potensial sebagai penghasil AIA (Sahasrabudhe, 2011). Isolat-isolat penghasil AIA yang dihasilkan dalam studi ini ikut memperkaya koleksi mikroba pemacu pertumbuhan tanaman baik endofit maupun dari rizosfer yang telah dilaporkan sebelumnya (Rubio *et al.*, 2000; Karnwal, 2009; Mohite, 2013).

Studi ini menunjukkan bahwa inokulasi bakteri penghasil AIA meningkatkan perkecambahan benih padi secara nyata dibandingkan kontrol atau tanpa inokulasi bakteri AIA. Peningkatan perkecambahan benih padi tersebut menunjukkan adanya AIA yang terkandung dalam kultur bakteri endofit (Idris *et al.*, 2007). Selain itu, hormon tumbuh dalam filtrat bakteri dapat memacu kecambah padi tersebut memiliki kemampuan sekresi AIA yang lebih tinggi dan lebih sensitif dalam mengubah AIA yang dimilikinya (Ryu *et al.*, 2003). AIA dari bakteri endofitik memberikan dampak morfologi akar seperti peningkatan densitas, panjang dan area permukaan akar. Perkembangan akar tersebut akan menyebabkan perluasan serapan hara sehingga menambah biomasa tajuk dan akar. Sesuai dengan vigor benih, dalam penelitian ini memberi petunjuk bahwa isolat dengan AIA tinggi belum tentu menghasilkan berat kering akar tinggi, meskipun AIA diketahui memacu perlanjangan akar dengan peningkatan jumlah rambut akar dan akar lateral (Shahab *et al.*, 2009). Hasil ini sesuai dengan laporan sebelumnya bahwa AIA yang rendah ($<10^{-5}$ g/L) memacu pemanjangan sel-sel akar dan sebaliknya. Namun demikian konsentrasi AIA yang tinggi juga dapat menghambat pemanjangan batang dikarenakan adanya sintesis zat pengatur tumbuh lain seperti etilen yang memberikan pengaruh berlawanan terhadap AIA (Rahman *et al.*, 2007).

Dengan demikian kerja AIA erat kaitannya dengan hormon tumbuh lainnya baik yang sinergis maupun antagonis dalam tanaman. Pertumbuhan tanaman erat kaitannya dengan pembelahan sel yang berarti peningkatan jumlah dari sel

sekretori, sedangkan pembesaran sel berhubungan dengan ukuran sel atau diameter sel sekretori. AIA tidak memberikan respon yang sama pada organ tanaman yang berbeda. Perbedaan respon tanaman terhadap inokulasi mikroba penghasil AIA juga dipengaruhi oleh variasi konsentrasi AIA yang dihasilkan dan tipe mikroba (Sarwar dan Frankenberger, 1994; Shahab *et al.*, 2009).

Pertumbuhan dan perkembangan sel erat kaitannya dengan peningkatan berat kering (Overvoorde *et al.*, 2010). Oleh karena itu jumlah dan ukuran sel sekretori berhubungan erat dengan berat kering rimpang yang dihasilkan. Pemberian AIA yang memberikan berat kering akar tetap seperti yang ditunjukkan dalam studi ini, mengindikasikan bahwa ketika jumlah sel yang terbentuk semakin banyak akan diimbangi dengan ukuran sel yang semakin kecil. Sesuai pendapat sebelumnya (Patten and Glick, 2002; Leveau and Lindow, 2004) bahwa peningkatan pertumbuhan akar tanaman merupakan salah satu tanda utama tanaman tersebut telah diinokulasi oleh bakteri

Bedasarkan analisis molekuler, semua amplicon ke tiga isolat berukuran 1.400-1.600 bp (Gambar 2), sesuai dengan yang diharapkan dari ukuran gen-gen 16S rRNA bakteri (Botero *et al.*, 2005). Molekul ribosomal RNA sangat khas dan cukup bervariasi sehingga dapat dipakai untuk menggolongkan spesies ke dalam genus. Banyaknya posisi pada molekul 16S rRNA yang berevolusi secara bebas menyediakan data untuk menduga hubungan filogenetik sekelompok mikroba termasuk bakteri (Krimitzas *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Nobandegani *et al.*, 2015).

Berdasarkan analisis filogeni dari sikuen 16S rRNA strain-strain spesies *Bacillus* yang berfungsi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman, *Bacillus aryabhatai* 6KJ dan *B. cibi* 4PB serta *B. Marisflavi* 2KB menunjukkan kekerabatannya dengan anggota species dari genus *Bacillus* lainnya baik dari kelompok pemacu pertumbuhan tanaman ataupun sebagai agen lainnya yang diisolasi dari berbagai sumber sampel. Dengan demikian informasi

filogenetik terbukti dapat membantu identifikasi mikroba berdasarkan hubungan kekerabatannya.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat yang memiliki kemampuan dua terbesar dalam menghasilkan AIA adalah 6KJ dan 4PB. Isolat 2KB menghasilkan AIA rendah namun memberikan efek bagus terhadap vigor benih padi. Pemberian isolat bakteri dengan konsentrasi AIA tinggi dan rendah menghasilkan pertumbuhan yang tidak berbeda nyata terhadap vigor padi. Tiga isolat terpilih untuk disikuen gen 16S rRNA-nya menunjukkan bahwa isolat 6KJ, 4PB dan 2KB mempunyai homologi masing-masing 97% dengan *B. aryabhatai*, *B. cibi* dan *B. marisflavi* secara berurutan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dibiayai oleh DIPA BB Biogen-Kementerian Pertanian 2013 (RPTP Dr. Sutoro) dengan No kode proyek: 1798.009.011. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Ris Haryani dan teknisi di Lab. Mikrobiologi yang telah membantu kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-Baki AA and JD Anderson. 1973.** Vigor determination in soybean by multiple criteria. *Crop Science* **13**, 630-633.
- Ahmad F, I Ahmad and MS Khan. 2005.** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* **29**, 29-34.
- Amann RI, W Ludwig and KH Schleifer. 1994.** Identification of un-cultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *American Society for Microbiology News* **60**, 360-365.
- Bartel B. 1997.** Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 51-66.
- Bialek K, L Michalczuk, and JD Cohen. 1992.** Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **100**, 509-517.
- Botero LM, SD Imperio, M Burr, TR McDermott, M Young and DJ Hassett. 2005.** Poly (A) polymerase modification and reverse transcriptase PCR amplification of environmental RNA. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1267-1275.
- Glickmann E and Y Dessaux. 1994.** A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 793-796.
- Grimont PAD, M Vancanneyt, M Lefèvre, K Vandemeulebroecke, L Vauterin, R Brosch, K Kersters, and F Grimont. 1996.** Ability of biology and Biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the pseudomonas. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 510-527.
- Hartung JS. 1998.** Molecular probes and assays useful to identify plant pathogenic fungi, bacteria, and marked bio-control agents. In: *Boland, GJ and Kuykendall, LD (eds) Plant microbe interactions and biological control*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel and Hongkong. 393-413.
- Idris EE, DJ Iglesias, M Talon, and R Borriss. 2007.** Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **20**, 619-626.
- Karnwal A. 2009.** Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology* **91**, 61-63.
- Kim KY, MH Ko, and H Liu. 2013.** Phylogenetic relationships of *Pseudorasbora*, *Pseudopungtungia*, and *Pungtungia* (Teleostei; Cypriniformes; Gobioninae) inferred from multiple nuclear gene sequences. *BioMed Research International* **3**, 1-6.
- Krimitzas A, I Pyrri, VN Kouvelis, E Kapsanaki-Gotsi, and M A Typas. 2013.** A phylogenetic analysis of greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. *Bio-Med Research International*. **18**, 1-18.
- Lazo G, RR Roffey, and DW Gabriel. 1987.** Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **373**, 214-221.
- Leveau JH and SE Lindow. 2004.** Utilization of plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *American Society of Microbiology* **5**, 2365 - 2370.
- Lestari P, DN Susilowati and EI Riyanti. 2007.** Pengaruh hormon asam indol asetat yang dihasilkan *Azospirillum sp.* terhadap perkembangan akar padi. *Jurnal AgroBiogen* **2**, 66-72.
- Ludwig W and KH Schleifer. 2002.** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Review* **15**, 155-173.
- Manuel AE, EL Periago, EM Carballo, JS Gándara, JC Mejuto and LG Río. 2008.** The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **123**, 247-260.
- Marchesi JR, T Sato, AJ Weightman, TA martin, JC Fry, SJ Hiom, D Dymock and WG Wade. 1998.** Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 795-799.
- Maslahat M and Suharyanto. 2005.** Produksi indole acetic acid oleh bakteri yang diisolasi dari akar tanaman karet (*Hevea brasiliensis*). *Jurnal Nusa Kimia* **5**, 26-35.
- Minamisawa K, KI Ogawa, H Fukuhara, and J Koga. 1996.** Indole pyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. *Plant and Cell Physiology* **37**, 449-453.
- Mohite B. 2013.** Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science*

- and *Plant Nutrition* **13**, 638-649.
- Nobandegani MBJ, HM Saud, and WM Yun. 2015.** Phylogenetic relationship of phosphate solubilizing bacteria according to 16S rRNA genes. *BioMed Research International* **5**, 1-5.
- Overvoorde P, H Fukaki and T Beeckman. 2010.** Auxin control of root development. Cold Spring Harb. *Perspective in Biology* **2**, a001537.
- Patten CL and BR Glick. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* in indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3795-3801.
- Rahman A, A Bannigan, W Sulaman, P Pechter, EB Blancaflor and TJ Baskin. 2007.** Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *The Plant Journal* **50**, 514-528.
- Rajapaksha RMCP, MA Tobor-Kapon and E Bååth. 2004.** Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2966-2973.
- Rubio MGT, SAV Olata, JB Castillo and PM Nieto. 2000.** Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* **42**, 171-176.
- Ryu CM, MA Farag, CH Hu, M Reddy, HX Wei, PW Paré, and J Kloepper. 2003.** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceeding of the National Academy of Science. United States of America* **100**, 4927-4932.
- Sahasrabudhe MM. 2011.** Screening of rhizobia for indole acetic acid production. *Annals of Biological Research* **2**, 460-468.
- Sarwar M and WT Frankenberg. 1994.** Tryptophan dependent biosynthesis of auxin in soil. *Plant and Soil* **160**, 97-104.
- Shahab S, N Ahmed and NS Khan. 2009.** Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research* **4**, 1312-1316.
- Spaepen S, J Vabderleyden and R Remans. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* **31**, 425-448.
- Widiastuti H, Siswanto and Suharyanto. 2010.** Karakterisasi dan seleksi beberapa isolat *Azotobacter* sp. untuk meningkatkan perkecambahan benih dan pertumbuhan tanaman. *Buletin Plasma Nutrafah* **16**, 160-167.
- Wright AD, MB Sampson, MG Neuffer, L Michalczuk, JP Slovin and JD Cohen. 1991.** Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* **254**, 998-1000.