



PROSIDING
SEMINAR
PERHIMPUNAN ILMU PENYUJUAN INDONESIA
(PERIPU)



**"Pemanfaatan Plasma Nutfah Lokal untuk Perakitan Jenis Unggul
dalam Menghadapi Perubahan Iklim dan Mencapai Ketahanan Pangan"**

Dalam Rangka:

DIES NATALIS KE 57 FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS ANDALAS

Padang, 9 Desember 2011

ISBN 9786021800607

Supported by :



**PROSIDING SEMINAR NASIONAL
PERIPI REGIONAL SUMATERA**

PEMANFAATAN PLASMA NUTFAH LOKAL UNTUK
PERAKITAN JENIS UNGGUL DALAM MENGHADAPI
PERUBAHAN IKLIM DAN MENCAPAI KETAHANAN PANGAN

Tim Penyunting:

Etti Swasti

Muhammad Syukur

Sutoyo

Hamda Fauza

Desain Sampul : Hamda Fauza dan Guntur Gumilang

Tata Letak Isi:

P K. Dewi Hayati

Nurwanita Ekasari Putri

Yusniwati

Dini Hervani

Lily Syukriani

Buku ini diterbitkan sebagai prosiding Seminar Nasional PERIPI Regional Sumatera yang diselenggarakan pada tanggal 9-10 Desember 2011.

Perpustakaan Nasional Katalog Dalam Terbitan (KDT)

PEMANFAATAN PLASMA NUTFAH LOKAL UNTUK PERAKITAN JENIS
UNGGUL DALAM MENGHADAPI PERUBAHAN IKLIM DAN MENCAPAI
KETAHANAN PANGAN

Andalas University Press, 2012

447 hlm, ukuran A4

ISBN : 978-602-18690-9-1

Istino Ferita, dan Hamda Fauza).....	373
Pematahan Dormansi Benih Aren dengan beberapa Perlakuan Benih (Nalwida Rozen).....	378
Karakteristik Fase Kematangan Buah Jarak Pagar (<i>Jatropha curcas</i> L.) Pada Pertumbuhan Awal (Edi Susilo).....	383
Konservasi Plasma Nutfah Tanaman Kina (<i>Conchonia</i> sp) Secara In Vitro (Reni Mayerni and Nasrez Akhir).....	392
Upaya Perbanyakan Tanaman Penghasil Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lank) secara in vitro (Gustian, Benni Satria dan Etti Swasti).....	399

D. MIKROBIOLOGI

Deteksi dan Karakterisasi Molekular <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i> Berdasarkan Serine Protease dan Sekuen Gen 16S rRNA (Aprizal Zainal, Aswaldi Anwar, Sudarsono, Satriyas Ilyas, Giyanto).....	409
Isolasi Dan Karakterisasi Rhizobakteria Penghasil Iaa Dari Rhizosfir Titonia (<i>Tithonia diversifolia</i>) (Agustian, Suci Rahmayuni dan Oktanis Emalinda).....	426
Isolasi Bakteri Penghasil IAA Dari Tanah Masam Dan Identifikasi Secara Molekuler (Lily Syukriani, Jamsari dan Gustian).....	438

PENDAHULUAN

Populasi tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malaccensis*) di Indonesia semakin menurun. Banyak faktor yang menyebabkan penurunan populasi ini, salah satunya adalah pemburuan gaharu yang tidak bertanggung jawab. Akibatnya, populasi tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malaccensis*) semakin menurun. Untuk mempertahankan populasi tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malaccensis*) secara berkelanjutan, diperlukan upaya konservasi dan pemuliaan. Salah satu upaya konservasi adalah dengan melakukan kultur jaringan. Kultur jaringan adalah teknik untuk memperbanyak tanaman secara aseptik di laboratorium. Teknik ini dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malaccensis*) secara massal. Selain itu, kultur jaringan juga dapat digunakan untuk mempelajari fisiologi dan morfologi tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malaccensis*).

**ISOLASI BAKTERI PENGHASIL IAA DARI TANAH MASAM DAN
IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER
ISOLATION OF IAA PRODUCING BACTERIA FROM ACID SOIL AND
MOLECULER IDENTIFICATION**

Lily Syukriani¹, Jamsari¹, Gustian¹

¹Staf pengajar jurusan BDP Faperta Unand

Abstract

Experiments on the Isolation of IAA producing bacteria from acid soil and moleculer identification have been undertaken in the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding Faculty of Agriculture, Andalas University in Padang. The experiment was conducted from May 2009 until May 2010. The purpose of this study were to obtain bacterial isolates capable of producing high IAA from acid soils and moleculer identification using 16S rRNA gene. This experiment consisted of 2 stages: (i) Identification and characterization of bacteria in morphology and molecular. The soil samples were taken from the area around campus experiment station Unand Limau Manih on some rhizosfir crops such as Alang-alang (*Imperata cylindrica*), Sikaduduk (*Melastoma malabathricum*), Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*), Paku resam (*Dicranopteris linearis*), Pimping (*Themeda gigantea*) and *Polysticum* sp. Bacteria isolate that could produce high IAA were subjected to the next molecular identification using 16S rRNA gene. 50 bacterial isolates were selected based on shape and color of the colony. Isolate Alang-alang-10 known to have the ability to produce highest IAA compared to other isolates. That's why the bacterial isolates Alang-alang-10 was selected for further molecular characterization using 16S rRNA gene. Based on BLAST analysis showed that isolates Alang-alang-10 is a bacterium of the genus *Acinetobacter*.

Key words : *Bacteria, IAA, Acid soil, 16S rRNA gene*

PENDAHULUAN

Luas daerah di Sumatera Barat adalah 3,67 juta ha dimana 635.500 ha merupakan tanah ultisol yang bereaksi masam (Fiantis, 2003). Permasalahan pada ultisol adalah ketersediaan hara makro (N, P, K, Ca, Mg) yang sangat rendah, sebaliknya ketersediaan hara mikro (Fe, Cu, Mn, Zn) pada tanah tersebut tinggi. Kelarutan Aluminium sangat tinggi sehingga dapat meracuni tanaman (Hardjowigeno, 2003; Fiantis, 2003). Keracunan Aluminium dapat menghambat pembelahan sel akar tanaman, dimana akar tumbuh pendek-pendek dan tebal, sehingga akar sulit untuk menembus lapisan tanah dan menghambat serapan hara dan air, selanjutnya pertumbuhan tanaman terganggu serta menurunkan produksi (Hakim, 2006).

Beberapa solusi yang telah berhasil dilakukan untuk mengatasi permasalahan pada ultisol seperti menaikkan pH melalui pengapuran, pengikatan Aluminium dengan penambahan pupuk P yang banyak dan khelat Al dengan penambahan bahan organik

Seminar Perhimpunan Pemuliaan Indonesia, 9-10 Padang Desember 2011

(Nyakpa, *et al.* 1988). Upaya-upaya tersebut masih kurang efektif dan efisien karena besarnya biaya pembelian kapur dan pupuk serta biaya pengangkutan yang harus dikeluarkan.

Saat ini penggunaan pupuk hayati lebih digalakkan karena biaya pembelian pupuk tidak mahal, pengaplikasian mudah, tidak merusak tanah dan ramah lingkungan. Pupuk hayati ini mengandung berbagai macam mikroorganisme yang dapat memacu pertumbuhan tanaman melalui produksi hormon pertumbuhan seperti auksin, giberelin dan sitokinin. Mikroorganisme yang terdapat dalam pupuk hayati sebaiknya adalah mikroorganisme *indigenous* yang nantinya akan lebih mudah berinteraksi kembali ke lingkungannya.

Pada penelitian ini diharapkan akan diperoleh rhizobakteria-rhizobakteria *indigenus* yang mampu bertahan hidup pada kondisi tanah masam seperti ultisol. Kemampuan suatu tanaman untuk tumbuh baik pada kondisi lingkungan yang miskin hara dipengaruhi oleh interaksi akar tanaman dengan mikroorganisme yang berada di dalam tanah. Akar tanaman akan mengeluarkan sisa-sisa metabolisme (eksudat akar) yang oleh beberapa mikroorganisme dalam tanah seperti rhizobakteria akan dimanfaatkan untuk kelangsungan hidupnya (Husin, 2004). Salah satu sisa metabolisme yang dikeluarkan oleh akar tanaman adalah tryptophan, beberapa mikroorganisme ada yang memiliki kemampuan untuk mensintesis tryptophan menjadi IAA. IAA dapat meningkatkan pertumbuhan akar tanaman secara langsung dengan menstimulasi pemanjangan sel atau pembelahan sel (Patten dan Glick, 2002).

Salah satu mekanisme yang dapat dilakukan oleh mikroorganisme dalam memacu pertumbuhan tanaman adalah produksi hormon pertumbuhan. Kemampuan fiksasi nitrogen dari udara untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen tanah, serta penghasil osmoprotektan pada kondisi cekaman kekeringan (Kloepper, 1992). Hormon pertumbuhan tersebut adalah auksin, giberelin, etilen dan asam abisis yang dapat mempengaruhi proses fisiologi tanaman meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Auksin sangat berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman terutama dalam perbesaran dan pembelahan sel, mempengaruhi permeabilitas membran sel, peningkatan respirasi pada jaringan tanaman, memacu sintesis messenger RNA serta protein-enzim berupa protein struktural, inisiasi pembentukan akar (Wattimena, 1992; Heddy, 1996).

Identifikasi secara molekuler untuk mengetahui genus atau kelompok bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan gen 16 S rRNA. Hal ini disebabkan karena molekul rRNA mengandung urutan yang sangat konservatif secara evolusi. Menurut Richana, *et al.* (2008) urutan yang lebih beragam dari molekul 16S rRNA sangat cocok untuk membedakan suatu organisme ke dalam taksa yang lebih rendah seperti genus dan spesies. Urutan 16S rRNA ini juga menyediakan data yang secara statistik cukup valid.

Penelitian ini bertujuan untuk (1) Mendapatkan isolat-isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA yang tinggi dari tanah masam. (2) Mengidentifikasi spesies atau genus dari isolat bakteri terbaik yang menghasilkan IAA secara molekuler

METODOLOGI

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Mei 2009–Oktober 2009, di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Jurusan BDP Faperta Unand. Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu (1) isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri

Seminar Perhimpunan Pemuliaan Indonesia, 9-10 Padang Desember 2011

penghasil IAA dan (2) Identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16 S rRNA. Bahan yang digunakan untuk tahap I penelitian ini adalah sampel tanah dari rizosfir tumbuhan sikaduduk (*Melastoma malabathricum*), alang-alang (*Imperata cylindrica*), karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*), paku resam (*Dicranopteris linearis*), pimping (*Themeda gigantea*) dan *Polysticum* sp, keseluruhan tanaman tersebut tumbuh di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Bahan-bahan kimia yang dipergunakan antara lain FeCl_3 0.5M + H_2SO_4 (Pereaksi Salskowsky), 0.05 g IAA, larutan fisiologis (NaCl) 0,85 %, media King's B (Protease pepton 20 g/L, Glycerol 10 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L, Bacto agar 15 g/L), nutrient agar (HIMEDIA-India), aquades, KOH 3 %, beef extract (HIMEDIA-India), peptone (HIMEDIA-India), agar bakteri (HIMEDIA-India), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, protease pepton, glyserin, KH_2PO_4 , MgSO_4 , tris, ddH_2O , buffer 1 X TE, SDS 10%, proteinase K, lysozim, NaCl 5 M, isopropanol, ethanol 70%, alkohol 70%, agarose, buffer TBE, ethidium bromide, bromo phenol blue (BPB), DNA lambda, bead RTG-PCR (GE-Health care-UK), primer gen 16S-rRNA 27 F dan 1525 R, kertas label, aluminium foil, kertas wrap dan spritus. Beberapa peralatan yang digunakan antara lain gelas ukur, gelas objek, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, korek api, *Laminar Air Flow Cabinet*, bunsen, autoclave, kompor listrik, *magnetic stirrer*, oven, lemari es, *colony counter*, kamera digital, pipet tetes, vortex, tabung *eppendorf* 2 dan 1,5 ml, botol reagen, botol media, pipet mikro, mesin PCR (Biometra Jerman), alat sentrifus, elektroforesis horizontal, tissue, *gel dokumentasi system*, lampu UV, spektrofotometer, nampan plastik, tusuk gigi, dan alat-alat lainnya.

PROSEDUR KERJA

Tahap 1. Identifikasi morfologi, fisiologis

1. Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri menggunakan teknik pengenceran seri. Suspensi ini diencerkan secara seri sampai 10^{-7} , 1 ml suspensi dari masing-masing seri (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium NA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang, kemudian diamati warna dan bentuk koloninya.

2. Uji Reaksi Gram

Reaksi gram bertujuan untuk mengetahui apakah isolat tersebut bersifat gram negatif atau gram positif dengan menggunakan KOH 3%.

3. Uji Pigmen Fluorescen

Uji pigmen fluoresen menggunakan medium king's B. Satu koloni bakteri digoreskan pada medium king's B, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Bila terbentuk warna kuning kehijauan di sinar UV, berarti bakteri tersebut menghasilkan pigmen fluoresen.

4. Uji Kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA

Pengujian kemampuan isolat dalam menghasilkan IAA dilakukan menggunakan metode Colorimetric Bric *et.al* (1990) yang dimodifikasi oleh Maira (2000). Satu koloni isolat rhizobakteri yang tumbuh pada media king's B agar dimasukkan ke dalam 5 ml media king's B cair dengan menggunakan jarum ose, kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu ruang, setelah itu disentrifus selama 7 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Sebanyak 1 ml supernatan (cairan bening) dari masing-masing isolat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 4 ml pereaksi

salkowsky. Setelah 20-25 menit diamati warna supernatan, apabila berubah menjadi merah berarti bakteri tersebut mampu menghasilkan IAA. Absorban dari perubahan warna merah diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm. IAA murni digunakan sebagai standar dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 dan 45 ppm. Isolat yang menghasilkan IAA tertinggi selanjutnya yang akan dipergunakan untuk tahap kedua yaitu transformasi genetik.

Tahap 2. Identifikasi secara molekuler

a. Isolasi DNA genomik

Prosedur isolasi DNA bakteri menurut Leach, *et al.* (1990) yaitu satu koloni tunggal diinokulasikan ke dalam 10 ml media NA cair, dan dishaker semalaman. Kultur bakteri sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam ependorf dan disentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Pelet sel yang diperoleh diresuspensi dengan menambahkan 250 µl TE, kemudian tambahkan lisozym 5 µl (5µg/ml) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya tambahkan NaCl 5M sebanyak 65 µl dan 80 µl CTAB, dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C. Kemudian ditambahkan C:I (24:1) dengan volume yang sama dan dishaker selama 30 menit pada kecepatan 150 rpm setelah itu disentrifus selama 15 menit. Fase atas yang terbentuk dipindahkan ke tabung ependorf baru dan ditambahkan 600 µl isopropanol dingin. Tabung dibolak-balik kemudian disentrifus kembali. Pelet dicuci dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 700 µl. Pelet dikeringkan menggunakan *hot plate*, kemudian pelet dilarutkan dengan menambahkan TE sebanyak 50 µl dan disimpan pada suhu 20°C.

b. Amplifikasi Gen 16S rRNA

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan menggunakan kombinasi primer yang didesain dari sekuen gen 16S rRNA. Kombinasi primer yang digunakan adalah 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCARCC-3'). Amplifikasi dengan primer ini diperkirakan menghasilkan produk amplifikasi PCR sekitar 1500 bp. Reaksi PCR dilakukan pada total volume 25 µl yang terdiri dari 2 µl DNA templet, 2 µl kombinasi masing-masing primer 27F dan 1525R (5 pmol/µl), 21 µl ddH₂O PCR dalam RTG-PCR Bead. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus pada mesin PCR (Biometra-Jerman). Kondisi PCR yang digunakan adalah: denaturasi (94°C) selama 1 menit, annealing pada suhu 57°C selama 1 menit, ekstensi selama 1 menit pada suhu 72°C. Ekstensi tambahan dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit.

c. Sekuensing

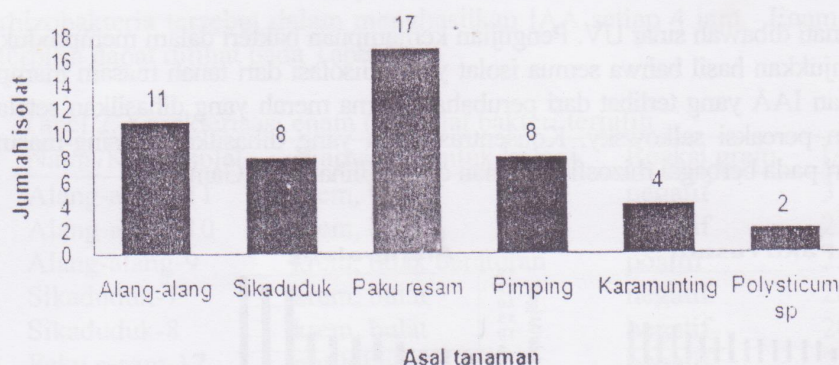
Sekuensing dilakukan di PT CPI (Charoen Phokphand Indonesia) di Jakarta. Sekuensing dilakukan satu arah (*one read direction*) menggunakan primer 1525R.

d. Analisis Data

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan program BLAST yang dilakukan secara online pada web site NCBI (National centre of Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dilakukan menggunakan teknik pengenceran seri selanjutnya dilakukan pemurnian untuk mendapatkan koloni tunggal. Kegiatan ini menghasilkan sebanyak 50 isolat bakteri yang diseleksi berdasarkan bentuk dan warna koloni. Jumlah isolat yang diperoleh berdasarkan jenis tanaman dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Jumlah isolat berdasarkan tanaman

Jumlah isolat bakteri yang diperoleh dari rhizosfir alang-alang 11 isolat, sedangkan dari rhizosfir sikaduduk diperoleh 8 isolat. Sebanyak 17 isolat bakteri diperoleh dari rhizosfir paku resam, dan 8 isolat dari rhizosfir pimping. Sementara itu 4 isolat dari rhizosfir karamunting dan 2 isolat dari rhizosfir *Polysticum* sp. Isolat terbanyak ditemukan dari rhizosfir paku resam dan alang-alang. Hal ini diduga disebabkan karena kedua tanaman ini merupakan vegetasi dominan yang tumbuh pada ultisol Limau Manis. Pengambilan sampel tanah juga lebih banyak dilakukan pada kedua rhizosfir ini.

Hasil identifikasi bakteri secara morfologi berdasarkan warna koloni dan bentuk koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

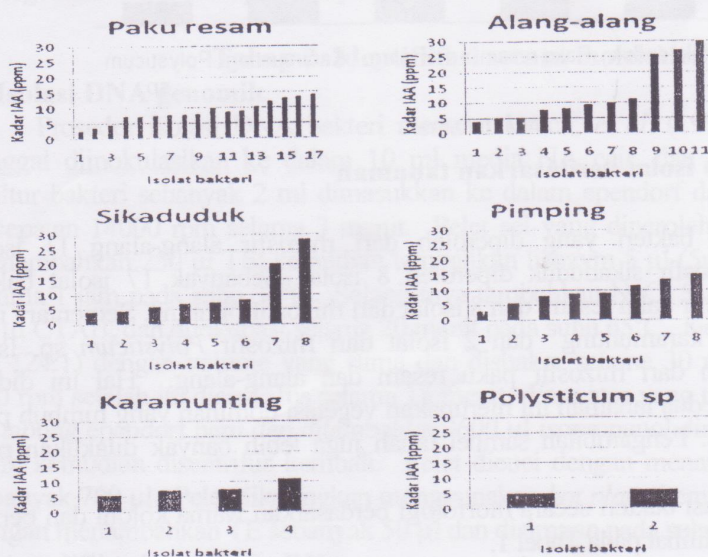
Tabel 1. Morfologi isolat bakteri berdasarkan warna dan bentuk koloni

Rhizosfir tanaman	Krem, bulat	Krem, tidak beraturan	Kuning, bulat	Kuning, tidak beraturan	Bening tidak beraturan	Putih, bulat
Alang-alang	7	2	-	1	1	-
Paku resam	7	4	3	-	-	4
Sikaduduk	5	1	-	1	-	1
Karamunting	2	1	1	-	-	-
Pimping	2	2	2	-	2	-
<i>Polysticum</i> sp	2	-	-	-	-	-

Berdasarkan uji gram menggunakan KOH 3% diketahui terdapat 22 isolat bakteri gram positif dan 28 isolat bakteri gram negatif. Karakterisasi lanjutan juga memperlihatkan bahwa bakteri gram negatif umumnya menghasilkan IAA yang lebih tinggi daripada bakteri gram positif. Disamping itu bakteri gram negatif teridentifikasi lebih banyak pada rhizosfir tanaman dari pada bakteri gram positif. Hal ini didukung oleh Husin (2004) yang menyatakan bahwa bakteri gram negatif sangat aktif di rhizosfir, sedangkan bakteri gram positif menunjukkan penurunan jumlah di dekat rhizosfir. Hal ini diduga disebabkan karena terdapatnya perbedaan pada komponen dinding selnya.

Uji pigmen fluorescen terhadap 50 isolat rhizobakteri pada media king's B memperlihatkan tidak ada satu isolat pun yang menghasilkan warna kuning kehijauan

setelah diamati dibawah sinar UV. Pengujian kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA menunjukkan hasil bahwa semua isolat yang diisolasi dari tanah masam mampu menghasilkan IAA yang terlihat dari perubahan warna merah yang dihasilkan setelah penambahan pereaksi salkowsky. Konsentrasi IAA yang dihasilkan masing-masing isolat bakteri pada berbagai rhizosfir tanaman dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Histogram kemampuan masing-masing isolat bakteri menghasilkan IAA pada berbagai rhizosfir tanaman

Jumlah isolat bakteri yang terdapat pada rhizosfir paku resam adalah 17 isolat, dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 2.8 ppm dan tertinggi 21.5 ppm. Rhizosfir alang-alang terdapat 11 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 4.2 ppm dan tertinggi 31.7 ppm. Rhizosfir sikaduduk terdapat 8 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 4.3 ppm dan tertinggi 28.4 ppm. Rhizosfir pimping terdapat 8 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 3.3 ppm dan tertinggi 15.3 ppm. Rhizosfir karamunting terdapat 4 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 5.9 ppm dan tertinggi 11.1 ppm. Rhizosfir *Polysticum* sp terdapat 2 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 4.9 ppm dan tertinggi 6.3 ppm. Perbedaan konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri pada rhizosfir tanaman yang berbeda diduga karena setiap tanaman mengeluarkan eksudat akar yang akan dimanfaatkan oleh mikroorganisme di dalam tanah. Frankenberger dan Arshad (1995) menyatakan bahwa produksi IAA sangat bervariasi antar spesies dan strain dalam genera yang sama dan juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, tingkat pertumbuhan dan ketersediaan substrat seperti asam amino.

Sejumlah 50 isolat bakteri yang menghasilkan IAA selanjutnya dipilih enam (6) isolat terbaik untuk melihat pertumbuhan dan kemampuan isolat

rhizobakteria tersebut dalam menghasilkan IAA setiap 4 jam. Enam isolat yang terpilih dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakterisasi enam (6) isolat bakteri terpilih

Nama/Kode isolat	Warna & Bentuk koloni	Reaksi gram	IAA (ppm)
Alang-alang-11	krem, bulat	negatif	31,7
Alang-alang-10	krem, bulat	negatif	27,0
Alang-alang-9	krem, tidak beraturan	positif	25,7
Sikaduduk-7	krem, bulat	negatif	20,2
Sikaduduk-8	krem, bulat	negatif	28,4
Paku resam-17	putih, bulat	negatif	21,5

Pengamatan dilakukan setiap 4 jam untuk melihat kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA dan pengamatan dimulai pada jam ke-20.

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh enam (6) isolat terpilih

Isolat	Konsentrasi IAA (ppm)									
	20 jam	24 jam	28 jam	32 jam	44 jam	48 jam	52 jam	56 jam	68 jam	72 jam
Alang-alang-9	4.1	8.9	7.8	7.5	16.	10.	3.8	2.1	3.1	3
Alang-alang-10	9	13.	11.	10.	7	4	12.	7.5	10.	6.6
Alang-alang-11	1.6	7	1	3	18.	15.	2	2.5	8	4.5
Sikaduduk-7	1.9	3.9	1.7	2.9	5	3	4.6	1.6	6	1
Sikaduduk-8	3.9	3.9	2	3.7	9.5	10	3.1	2.5	4	3.8
Paku resam-17	1.7	5.3	3.6	1.9	9.1	9.6	4.5	2.1	8.5	3
		2.9	6.7	2.2	10.	10	3.8		3.1	
					2	10.				
					10.	4				
					1					

Isolat Alang-alang-11, Paku resam-17 dan Sikaduduk-7 mampu menghasilkan IAA sekitar 2 ppm pada jam ke-20, sedangkan isolat Sikaduduk-8 dan Alang-alang-9 menghasilkan IAA sekitar 4 ppm pada waktu yang sama, dan isolat Alang-alang-10 mampu menghasilkan IAA sampai sekitar 9 ppm. Peningkatan dalam produksi IAA terjadi pada jam ke-24. Jam ke-28 dan jam ke-32 terjadi penurunan kembali pada semua isolat kecuali isolat Paku resam-17 mengalami peningkatan sampai pada jam ke-28 yang kemudian baru mengalami penurunan pada jam ke-32. Peningkatan produksi IAA yang cukup tajam terjadi mulai pada jam ke-32 sampai jam ke-44 dimana pada fase ini bakteri telah beradaptasi dengan lingkungannya dan sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Produksi IAA oleh bakteri menunjukkan grafik yang relatif tetap terjadi pada jam ke-44 sampai jam ke-48. Hal ini diduga disebabkan karena kadar nutrisi pada media telah berkurang sehingga terjadi akumulasi produk toksik yang mengganggu pembelahan sel. Kondisi yang demikian dapat

mengaktifkan gen-gen tertentu untuk mengkatalis senyawa intermediet menjadi IAA (Spaepens, *et al.* 2007). Hal yang sama juga dijumpai pada penelitian yang dilakukan oleh Gusmaniar (2007) dan Kresnawaty, *et al.* (2008) dimana produksi IAA tertinggi terdapat pada waktu inkubasi selama 48 jam. Saat interval jam ke-48 sampai jam ke-56 produksi IAA mulai mengalami penurunan dan pada jam ke-68 kembali terjadi kenaikan yang diduga disebabkan terjadi lisis pada sel yang telah mati. Sel-sel mati tersebut kemungkinan menjadi nutrisi bagi sebagian sel yang masih hidup sehingga memungkinkan terjadinya pertumbuhan baru (*cryptic growth*). Selanjutnya pada jam ke-72 produksi IAA mengalami penurunan tajam yang berarti rhizobakteri memasuki fase kematian.

Berdasarkan data yang diperoleh, isolat Alang-alang-10 diketahui memiliki kemampuan menghasilkan IAA paling tinggi dibandingkan lima isolat yang lain. Isolat bakteri Alang-alang-10 selanjutnya diidentifikasi secara molekuler untuk mengetahui genus atau kelompok bakterinya. Identifikasi dilakukan berdasarkan urutan 16S rRNA karena molekul rRNA mengandung urutan yang sangat konservatif secara evolusi. Hasil yang diperoleh berdasarkan analisis BLAST dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4. Data hasil analisis BLAST isolat bakteri terpilih Alang-alang-10

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FN563421.1	Acinetobacter genomosp. 3 partial 16S rRNA gene, strain bpoe1350	1368	1368	96%	0.0	93%
FN563419.1	Acinetobacter genomosp. 3 partial 16S rRNA gene, strain bpoe1348	1368	1368	96%	0.0	93%
G0487956.1	Uncultured bacterium clone G10-41 16S ribosomal RNA gene, partial s	1368	1368	96%	0.0	93%
FM872682.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone FA02D03	1368	1368	96%	0.0	93%
EU987288.1	Acinetobacter sp. Xa6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1368	1368	96%	0.0	93%
EU116047.1	Acinetobacter calcoaceticus strain D9 16S ribosomal RNA gene, partial	1368	1368	96%	0.0	93%
AJ346313.2	Acinetobacter calcoaceticus strain HPC253 16S ribosomal RNA gene, c	1368	1368	96%	0.0	93%
U088983.1	Acinetobacter calcoaceticus partial 16S rRNA gene, type strain NCCB 2	1368	1368	96%	0.0	93%

Berdasarkan Tabel 4. dapat dilihat bahwa isolat bakteri Alang-alang-10 merupakan bakteri dari genus *Acinetobacter*. Tingkat pensejajaran sekuen *query* (sekuen yang belum memiliki informasi biologi) dengan sekuen database genbank NCBI memiliki persentase kesamaan yang tinggi yaitu 93%. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Prashant, *et al.* (2008) menyatakan bahwa bakteri *Acinetobacter calcoaceticus* merupakan bakteri gram negatif, mampu menghasilkan IAA, siderophor, dan sebagai pelarut fosfat. Hal ini hampir sama dengan kemampuan isolat Alang-alang-10 yang merupakan bakteri gram negatif dan mampu menghasilkan IAA. Sedangkan kemampuannya dalam menghasilkan siderofor dan pelarut fosfat masih perlu diteliti lebih lanjut. Penelitian lain yang dilakukan oleh Huddedar, *et al.* (2002) menyatakan bahwa 8 strain *Acinetobacter* yang di isolasi dari rhizosfir tanaman gandum keseluruhannya mampu menghasilkan IAA.

KESIMPULAN

1. Bakteri yang telah diisolasi dari tanah masam sebanyak 50 isolat mampu menghasilkan IAA berkisar dari 2,8–31,7 ppm, dan produksi IAA tertinggi terdapat pada isolat Alang-alang-10.

2. Hasil identifikasi secara molekuler memperlihatkan bahwa isolat Alang-alang-10 merupakan bakteri *Acinetobacter*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Dana DIPA Universitas Andalas Tahun Anggaran 2009, dan juga merupakan sebahagian dari Tesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Fiantis, D. 2003. Peta tematik dan dan layout peta Sumbar. Jurusan Tanah. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang.
- Frankenberger, Jr. W.T. and M. Arshad, 1995. *Phytohormones in soils. Microbial Production and Function*. Marcel Dekker, Inc. New York. 503 hal.
- Gusmaniar. 2007. Produksi IAA oleh *Rhizobium spp*, *Pseudomonas spp*, dan *Azotobacter sp*. dalam medium sintetik dan serum lateks *Hevea brasiliensis* Muels. Arg. dengan suplementasi tryptophan. Skripsi. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta.
- Hardjowigeno, Sarwono. 2003. Ilmu Tanah. Penerbit Akademika Pressindo. Jakarta. 286 hal.
- Hakim, Nurhajati. 2006. Pengelolaan Kesuburan Tanah Masam dengan Teknologi Pengapuran Terpadu. Andalas University Press.
- Heddy, Suwasono. 1996. Hormon tumbuhan. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 97 hal.
- Huddedar, S.B; Shete, A.M; Tilekar, J.N; Gore, S.D; Dhavale, D. D. and Chopade, B. A. 2002. Isolation characterization and plasmid pUPII26 mediated indole 3 acetic acid (IAA) production in *Acinetobacter* strains from rhizosphere of wheat. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 102-103: 21-39.
- Husin, E, F. 2004. Biologi tanah. Universitas Andalas. Padang.
- Kloepper J. W., Beauchamp CJ. 1992. A review of issues related to measuring of plant roots by bacteria. *Canadian J Microbiol* 8:1219-1232.
- Kresnawaty, I., Andanawanih, S., Suharyanto dan Panji, T. 2008. Optimasi dan pemurnian IAA yang dihasilkan *Rhizobium sp*. dalam serum lateks dengan suplementasi tryptophan dari pupuk kandang. *Menara perkebunan* 76(2), 74-82.
- Leach, J. E., White, F. W., Rhoads, M. L., and Leung, H. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 238-246.
- Maira, Lusi, 2000. Indole-3 acetic acid producing rhizobacteria and its potensial to enhance growth of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). Tesis. Agriculture science in Universiti Putra Malaysia.
- Nyakpa, Lubis, Pulung, Amrah, Munawar, Hong, dan Hakim. 1988. Kesuburan Tanah. Penerbit Universitas Lampung. Lampung.
- Patten CL, Glick BR. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Application Environment microbiology* 68:3795-3801

- Prashant,S., Makarand,R., Bhushan,C. dan Sudhir,C: - 2008. Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. *Malaysian Journal of Microbiology*. Vol 5(1) 2009, pp 6-12.
- Richana,N., Irawadi, T.T., Nur, A. dan Syamsu, K. 2008. Isolasi identifikasi bakteri penghasil xilase serta karakterisasi enzimnya. *Jurnal Agro Biogen* 4(1):24-34.
- Spaepen, Vanderleyden dan Remans. 2007. Indole 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Review* (1-24). Blackwell Publishing Ltd.
- Wattimena, G.A. 1992. *Bioteknologi tanaman*. PAU-Bioteknologi IPB. Bogor. 309 hal.