

Potensi *Azotobacter* sebagai Penghasil Hormon IAA (*Indole-3-Acetic Acid*)

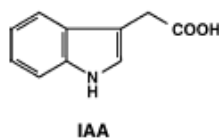
Fahima Tahta Kholida dan Enny Zulaika
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: enny@bio.its.ac.id

Abstrak—*Azotobacter* adalah kelompok bakteri rhizosfer yang dapat menambat N atmosferik. *Azotobacter* juga mampu mensintesis hormon pertumbuhan IAA (auksin alami) yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Tujuan penelitian ialah untuk mendapatkan isolat *Azotobacter* yang berpotensi menghasilkan hormon IAA (*Indole-3-Acetic Acid*). Purifikasi isolat *Azotobacter* dilakukan menggunakan media *Nutrient Agar*. Uji potensi sintesis IAA dilakukan dengan metode Salkowski pada media *Nutrient Agar*-triptofan yang ditunjukkan dengan perubahan warna merah pada isolat. Isolat *Azotobacter* yang mampu menghasilkan hormon IAA adalah isolat *Azotobacter* A1a, A1b, A3, A6, A9, dan A10 dengan isolat *Azotobacter* A9 dan A10 diindikasikan merupakan isolat yang produktivitas IAA nya lebih besar dibandingkan isolat lainnya.

Kata Kunci—*Azotobacter*, Hormon, *Indole-3-Acetic Acid*

I. PENDAHULUAN

INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) merupakan anggota utama dari kelompok auksin yang mengendalikan banyak proses fisiologis penting termasuk pembesaran dan pembelahan sel, deferensiasi jaringan dan respon terhadap cahaya dan gravitasi [1]. IAA memiliki struktur kimia yang dapat dilihat pada Gambar 1. Fitohormon IAA diketahui dapat menghasilkan lebih banyak akar lateral, rambut akar dan cabang rambut akar [2]. Keberadaan lima jalur biosintesis IAA yang berbeda telah diteliti dengan triptofan (Trp) sebagai precursor. Lima jalur tersebut ialah indole-3-piruvat (IpyA), indole-3-asetamida (IAM), triptamin (TAM), indole-3-asetonitril (IAN) dan jalur Trp cincin samping oksidase [3]. Eksudat akar merupakan sumber alami L-triptofan untuk mikroorganisme rizosfer yang dapat meningkatkan produksi IAA di daerah rizosfer. Biosintesis IAA dalam tanah dapat dipacu dengan adanya triptofan yang berasal dari eksudat akar atau sel-sel yang rusak atau membusuk [4].



Gambar 1. Struktur Kimia *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) [5].

Azotobacter sp. adalah bakteri gram negatif, bersifat aerobik, polymorphic dan mempunyai berbagai ukuran dan bentuk [6]. Sel *Azotobacter* berbentuk rod besar atau cocci.

Mempunyai diameter 2-4 μm atau lebih. Beberapa spesies adalah motil dengan flagel peritrikus. Ketika mereka tumbuh di N_2 sebagai sumber nitrogen, perluasan kapsul atau lapisan lendir biasanya diproduksi oleh spesies dari bakteri yang menfiksasi nitrogen bebas. Lapisan tersebut melindungi enzim nitrogenase di dalam sitoplasma [7]. *Azotobacter* dapat membentuk struktur istirahat yang disebut *cysts*. Salah satu spesies *Azotobacter* diketahui memiliki kemampuan untuk menghasilkan amonia, vitamin dan zat pertumbuhan yang meningkatkan perkecambahan biji, produksi asam indole asetat dan hormon lain yaitu giberelin dan sitokinin [8]. *Azotobacter* spp. dari *Eco Urban Farming ITS* diketahui berpotensi menghasilkan enzim merkuri reduktase yang dapat digunakan untuk mendegradasi logam berat merkuri HgCl_2 [9]. Berdasarkan kemampuannya tersebut dilakukan penelitian yang menguji potensi *Azotobacter* yang diisolasi dari *Eco Urban Farming ITS* sebagai penghasil IAA.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Februari hingga April 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

B. Purifikasi Isolat *Azotobacter*

Sepuluh isolat *Azotobacter* koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS dilakukan purifikasi kembali untuk memastikan isolat tersebut murni dan beradaptasi kembali pada media pertumbuhan yang baru. Purifikasi dilakukan dengan menggoreskan 1 ose isolat bakteri dengan metode streak 16 pada agar datar *Nutrient Agar*. Kemudian diinkubasi hingga isolat tumbuh dan diamati pertumbuhan koloni isolat. Purifikasi dilakukan hingga koloni isolat yang teramati seragam.

C. Subkultur *Azotobacter*

Isolat *Azotobacter* masing-masing diinokulasikan secara aseptis pada *Nutrient Agar* miring. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

D. Pereaksi Salkowski

Pereaksi Salkowski dibuat dengan mencampurkan 2 ml larutan FeCl_3 0,5M dan 98 ml HClO_4 35 % (Mali dan

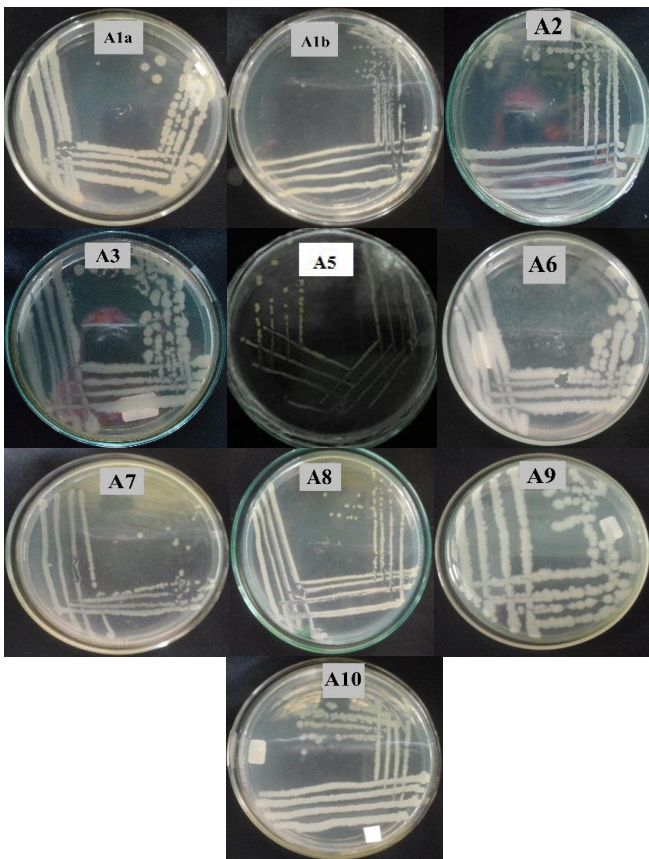
Bodhankar, 2009). Larutan dimasukkan ke dalam botol gelap. Pereaksi Salkowski akan membentuk warna kemerahan hingga merah saat bereaksi dengan IAA.

E. Uji Potensi Produksi IAA

Isolat *Azotobacter* diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* datar yang disuplementasi triptofan dengan konsentrasi 100 ppm menggunakan metode *streak plate*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Pereaksi Salkowski diteteskan pada isolat *Azotobacter* yang telah tumbuh di medium *Nutrient Agar* datar sampai merata. Selanjutnya isolat yang telah ditetesi pereaksi Salkowski disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna koloni isolat menjadi merah.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

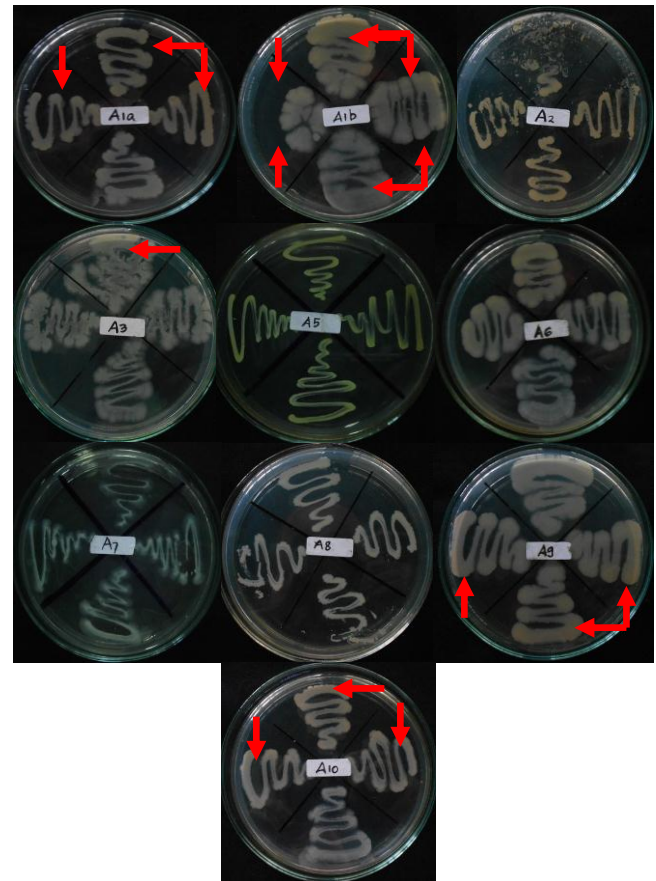
Pufikasi isolat *Azotobacter* bertujuan untuk memurnikan isolat bakteri dan beradaptasi pada media pertumbuhan baru setelah dalam kultur awetan. Purifikasi dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Pada Gambar 2 ditampilkan hasil uji purifikasi isolat *Azotobacter*.



Gambar 2. Hasil purifikasi isolat *Azotobacter* A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10 yang telah murni.

Produksi IAA oleh isolat *Azotobacter* diuji secara kualitatif menggunakan metode Salkowski yang dilakukan dengan streak plate pada agar datar yang disuplementasi triptofan. Suplementasi menggunakan triptofan dibutuhkan karena triptofan merupakan prekursor primer dalam biosintesis IAA [10].

Pada uji potensi produksi IAA 6 isolat terindikasi mampu memproduksi hormon IAA yaitu isolat *Azotobacter* A1a, A1b, A3, A6, A9 dan A10 dan 4 isolat yang lain yaitu A2, A5, A7 dan A8 tidak mengalami perubahan warna. (Gambar 3). Kemampuan isolat menghasilkan IAA ditunjukkan dengan perubahan warna isolat menjadi kemerahan. Perubahan warna untuk setiap isolat berbeda-beda (Tabel 1).



Gambar 3. Isolat *Azotobacter* setelah ditetesi Salkowski dan diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap.

Tabel 1. Potensi Isolat *Azotobacter* yang Berpotensi Menghasilkan Hormon IAA.

Isolat <i>Azotobacter</i>	Reaksi warna	Isolat <i>Azotobacter</i>	Reaksi warna
A1a	+	A6	+
A1b	+	A7	-
A2	-	A8	-
A3	+	A9	++
A5	-	A10	++

Keterangan: +++ : merah, ++ : merah muda, + : sedikit merah muda, - : tidak berwarna merah.

Isolat yang menunjukkan warna merah yang paling mencolok adalah isolat *Azotobacter* A9 dan A10 dan dimungkinkan dapat menghasilkan IAA lebih besar daripada 4 isolat lain. Perubahan warna kemerahan pada isolat setelah ditetesi pereaksi Salkowski terjadi karena adanya reaksi antara pereaksi Salkowski dengan IAA ataupun dengan beberapa senyawa pembentuk IAA. *Indole-3-acetic acid* (IAA) berikatan dengan FeCl₃ dan HClO₄ yang merupakan senyawa penyusun pereaksi Salkowski membentuk kompleks tris-(indole-3-aceto) iron (III) yang memberikan warna kemerahan hingga merah. Reaksi terjadinya perubahan warna merah pada isolat *Azotobacter* setelah

ditetesi pereaksi Salkowski ini mengindikasikan kemampuan bakteri tersebut dalam memetabolisme L-triptofan menjadi IAA [11].

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Chaiharh & Lumyong (2011), sebagian besar dari isolat bakteri akan memproduksi IAA lebih tinggi ketika ada penambahan prekursor L-triptofan dan sintesis IAA akan melalui jalur *Trp-pathways*. Pada kondisi alami, akar tanaman mensekresikan bahan organik termasuk L-triptofan yang dapat dimanfaatkan bakteri untuk biosintesis IAA [12].

IV. KESIMPULAN

Isolat *Azotobacter* koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS yang berpotensi menghasilkan hormon auksin (IAA) ialah *Azotobacter* A1a, A1b, A3, A6, A9 dan A10. *Azotobacter* A9 dan A10 berpotensi menghasilkan IAA lebih besar dibanding isolat lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis Fahima Tahta mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Dr. Enny Zulaika, MP. atas dukungan melalui pendanaan PNPB ITS sesuai dengan nomor kontrak 003246.256/IT2.11/PN.08/2015.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Shokri, D. and Emtiazi, G. "Indole-3-acetic acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria and its Optimization by Taguchi Design". *Curr Microbiol.* Vol. 61 (2010) 217-225.
- [2] Lestari, P.L., Susilowati, D.N., dan Riyanti, E.I. "Pengaruh Hormon Asam Indol Asetat yang Dihasilkan *Azospirillum* sp. terhadap Perkembangan Akar Padi". *Jurnal AgroBiogen.* Vol. 3, No.2 (2007) 66-72.
- [3] Szkop, M., and Bielawski, W. "A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid". *Antonie Van Leeuwenhoek.* Vol. 103 (2013) 683 – 691.
- [4] Chaiharh, M., dan Lumyong, S. "Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth". *Curr Microbiol.* Vol. 62 (2011) 173-181.
- [5] Dobrev, P.I., Havlicek, L., Vagner, M., Malbeck, J., dan Kaminek, M. "Purification And Determination Of Plant Hormones Auxin And Abscisic Acid Using Solid Phase Extraction And Two Dimensional High Performance Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography A.* Vol. 1075 (2005) 159-166.
- [6] Saribay, G. "Growth and Nitrogen Fixation Dynamics of *Azotobacter chroococcum* in Nitrogen-Free and OMW Containing Medium" thesis, The Middle East Technical University (2003).
- [7] Madigan, M. T., Martinko, J., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. *Brock Biology of Microorganisms 13th edition.* San Fransisco: Benjamin Cummings (2012).
- [8] Mali, G.V dan Bodhankar, M.G. "Antifungal and Phytohormone Production Potential of *Azotobacter chroococcum* Isolates from Groundnut (*Arachis hypogea* L.) Rhizosphere". *Asian J. Exp. Sci* Vol. 23, No.1 (2009) 293-297.
- [9] Sakinah, A.L., dan Zulaika, E. "Resistensi *Azotobacter* terhadap HgCl₂ yang Berpotensi Menghasilkan Enzim Merkuri Reduktase". *Jurnal Sains dan Seni Pomits.* Vol. 3, No.2 (2014) E84-E86.
- [10] Tanaka, E., Tanaka, C., Ishihara, A., Kuwahara, Y., dan Tsuda, M. "Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Aciculosporium takei*, a causal agent of witches' broom of bamboo". *J Gen Plant Pathol.* Vol. 69 (2003) 1–6.
- [11] Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y., dan Hashidoko, Y. "Salkowski's Reagent Test As A Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 74, No. 11 (2010) 1003600-1-7.
- [12] Ahmad, F., Ahmad, I., dan Khan, M.S. "Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan". *Turk J Biol* (2005) 29-34.