

## Pengukuran Indole-3-Acetic Acid (IAA) pada *Bacillus sp.* dengan Penambahan L-Tryptofan

*Measurement of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Bacillus sp. with the addition of L-Tryptofan*

Meli Astriani<sup>1\*</sup>, Hidayah Murtiyaningsih<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitas Muhammadiyah Palembang, Jl. Jenderal A. Yani 13 Ulu, Palembang 302663

<sup>2</sup>Universitas Muhammadiyah Jember, Jl. Karimata no.49 Jember

\*Email Korespondensi: meliastriani.g201@gmail.com



doi: <https://doi.org/10.29405/j.bes/22116-1212233>

Received: 10 Oktober 2018 | Accepted: 2 Desember 2018 | Published: 31 Desember 2018

### Abstrak

**Background:** Asam indol asetat (IAA) merupakan salah satu hormon pertumbuhan tanaman yang berperan penting dalam menstimulasi pertumbuhan tanaman. Peran IAA yang diproduksi eksogen dari bakteri mampu mempercepat pertumbuhan tanaman dalam memacu proses diferensiasi pada akar dalam membentuk rambut akar. Bakteri rizosfer kebanyakan sebagai penghasil IAA. *Bacillus sp.* merupakan salah satu bakteri rizosfer dari tanaman. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kandungan IAA dari *Bacillus sp.* dengan melakukan pengukuran kadar IAA menggunakan metode kolorimetri. **Metode:** Tahapan penelitian meliputi peremajaan isolat uji, pembuatan kurva standar IAA dan mengukur kadar IAA dengan direaksikan menggunakan reagen Salkowsky. **Hasil:** Hasil dari penelitian ini diperoleh kandungan IAA dari kultur *Bacillus sp.* yang ditambahkan L-triptofan yaitu sebesar 39,92ppm. **Kesimpulan:** Kandungan IAA yang dihasilkan *Bacillus sp.* tergolong cukup tinggi untuk dapat diaplikasikan sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman (PGPR).

**Kata kunci:** *Bacillus sp.*; metode kolorimetri; rizosfer; indole acetic acid

### Abstract

**Background:** Indole acetic acid (IAA) is a plant growth hormone that has an important role for stimulation growth of plants. The exogenous IAA produced by bacteria is able to accelerate the plant growth in improving process of root differentiation to form root hairs. Rhizosphere bacteria mostly known as a producer of IAA. *Bacillus sp.* is one of rhizosphere bacteria on plants. The aim of this study was to determine IAA content from *Bacillus sp.* by measuring the levels of IAA using colorimetric method. **Methods:** Stages of this study are as follows: recultures of testing isolates, manufactures IAA standard curve and measures levels of IAA which reacted to Salkowsky reagent. **Results:** Results showed that IAA content of *Bacillus sp.* which were obtained by adding L- tryptophan was 39.92 ppm. **Conclusions:** IAA content which produced by *Bacillus sp.* is high enough to be applied as a plant growth promoter bacteria (PGPR).

**Keywords:** *Bacillus sp.*; colorimetric method; rhizosfer; indole acetic acid

**Cara citasi:** Astriani, M. dan Murtiyaningsih, H. 2018. Pengukuran Indole-3-Acetic Acid (IAA) pada *Bacillus sp.* dengan Penambahan L-Tryptofan. *BIOEDUSCIENCE*, 2(2): 116-121. Doi: <https://doi.org/10.29405/j.bes/22116-1212233>



© 2018 Oleh authors. Lisensi Bioeduscience, Uhamka, Jakarta. Artikel ini bersifat open access yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan Creative Commons Attribution (CC BY) license. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## PENDAHULUAN

Modal dasar yang dibutuhkan untuk mencapai produktivitas tanaman adalah faktor pemupukan. Pupuk kimia yang digunakan untuk tanaman bersifat tidak ramah lingkungan. Penggunaan pupuk kimia dapat menurunkan kualitas tanah (Geisseler & Scow, 2014). Perkembangan teknologi telah mendorong berkembang produk alternatif yang ramah lingkungan. Salah satunya yaitu senyawa alami yang dapat memacu pertumbuhan tanaman. Senyawa alami yang dapat menstimulasi pertumbuhan tanaman yaitu senyawa fitohormon (Tahir *et al.*, 2017).

Fitohormon berperan penting dalam pengaturan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Menurut klasifikasi konvensional, terdapat lima kelompok fitohormon: auksin, giberelin, etilena, sitokinin, dan asam absisat. Peran fitohormon pada proses fisiologis beragam, termasuk mengatur masa dormansi dan perkecambahan biji, pembentukan akar, pematangan, serta pembentukan percabangan pada tanaman (Tsavkelova *et al.*, 2006). *Indole Acetic Acid* (IAA) adalah salah satu dari auksin yang paling aktif secara fisiologis.

Asam indol asetat (IAA) berperan sebagai salah satu hormon yang sangat penting selama pembentukan dan pertumbuhan vegetatif tanaman. Hormon ini memiliki peran yang penting dalam berbagai aspek, antara lain dalam proses pemanjangan dan pembelahan sel, diferensiasi, tropisme, dominansi apikal, absisi dan pembungaan (Zhao *et al.*, 2001).

IAA dapat diproduksi oleh tanaman secara endogen, namun IAA yang dihasilkan belum optimal, sehingga membutuhkan IAA yang berasal dari luar tanaman yaitu IAA eksogen. IAA eksogen berasal dari mikroorganisme yang hidup di sekitar rizosfer tanaman. Mikroorganisme penghuni rizosfer tanaman memanfaatkan eksudat tanaman (substrat) untuk mensintesis dan melepaskan auksin sebagai metabolit sekunder (Ljung, 2013). Jenis eksudat akar yang dikeluarkan oleh masing-

masing tanaman berbeda-beda dapat meliputi komponen gula, asam amino, dan asam organik (Carvalhais *et al.*, 2010).

IAA umum diproduksi dari metabolisme L-tryptofan oleh beberapa mikroorganisme termasuk Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Lynch., 1985; Shahab *et al.*, 2009). Jalur biosintesis IAA sangat bergantung pada komponen asam amino yang dikeluarkan yaitu triptofan sebagai prekursor sintesis IAA (Spaepen *et al.*, 2007). Asam indol asetat dan asam indol butirat diproduksi oleh bakteri dalam berbagai konsentrasi dengan penambahan triptofan memberikan efek stimulasi pada pertumbuhan akar dan pemanjangan tunas kacang hijau (*Vigna radiata*) (Shahab *et al.*, 2009).

Bakteri yang hidup di sekitar rizosfer tanaman dinamakan rizobakteria. Rizobakteria dikenal sebagai PGPR yang membantu banyak aspek pertumbuhan tanaman (Vassey, 2003). PGPR penting bagi bidang pertanian sebagai alternatif senyawa alami untuk mengurangi penggunaan pupuk sintesis (Tahir *et al.*, 2015). Sebagian besar mikroba yang ditemukan mampu mensintesis IAA merupakan mikroba hasil isolasi rizosfer tanaman. Beberapa bakteri rizosfer antara lain *Azospirillum sp.*, *Azotobacter sp.* dan *Enterobacter sp.* dapat memberikan efek menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman (Akbari *et al.*, 2007). *Bacillus sp.* merupakan salah satu bakteri yang berasal dari rizosfer tanaman. Berdasarkan informasi bahwa bakteri yang berasal dari rizosfer dapat bertindak sebagai pemacu pertumbuhan tanaman, maka perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengukur kandungan IAA (*Indole Acetic Acid*) dari *Bacillus sp.* yang menggunakan jalur indole-3-acetamide pathway dengan penambahan L-Triptofan.

## MATERI DAN METODE

### *Alat dan Bahan*

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu spektrofotometri UV-Vis. Bahan yang digunakan

meliputi bakteri *Bacillus sp.*, reagen Salkowsky, dan triptofan.

### Prosedur Penelitian

#### Peremajaan isolat

Peremajaan isolat bakteri dengan menumbuhkan stok *Bacillus sp.* pada medium *Nutrient Agar* (NA) dengan cara digores kuadran. Isolat yang telah murni dibuat replika sebagai biakan kerja.

#### Pembuatan Kultur Bakteri

Biakan *Bacillus sp.* dalam tabung miring diambil satu lup dengan menggunakan ose untuk dikulturkan dalam medium *Nutrient Broth* (NB) yang telah ditambahkan 1 mM L-triptofan. Kemudian diinkubasi pada inkubator bergoyang sampai kepadatan sel mencapai  $10^8$  sel/ml.

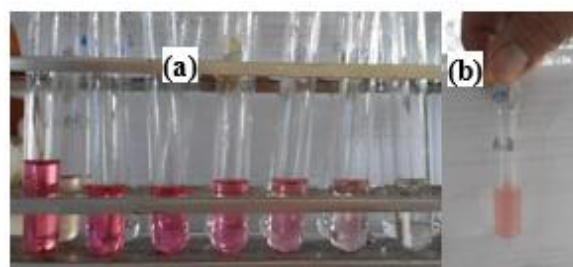
#### Pengukuran Kadar IAA dengan Metode Kolorimetri

Biakan bakteri yang telah dikulturkan dalam medium NB yang mengandung triptofan lalu disentrifugasi dengan kecepatan  $10.000 \times g$  suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 10 menit, kemudian supernatan hasil sentrifugasi diambil dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer untuk kemudian dijadikan sampel uji. Sebanyak 1 ml biakan bakteri ditambahkan dengan 2 ml reagen *Salkowsky* kemudian diinkubasi selama 15 menit di ruang gelap, dan selanjutnya diamati secara kualitatif berdasarkan perubahan warna menjadi merah muda yang mengindikasikan adanya aktivitas IAA. Selain itu secara kuantitatif diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang  $\lambda$  520 nm. Hasil absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar IAA 0-60 ppm untuk memperoleh konsentrasi akhir yang menunjukkan adanya aktivitas IAA dari bakteri yang diuji (Pattern & Glick, 2002).

### HASIL

Konsentrasi IAA dari *Bacillus sp.* diketahui dengan mengukur nilai absorbansi yang dibandingkan dengan IAA standar. Konsentrasi IAA standar dibuat mulai dari 0 ppm hingga 60

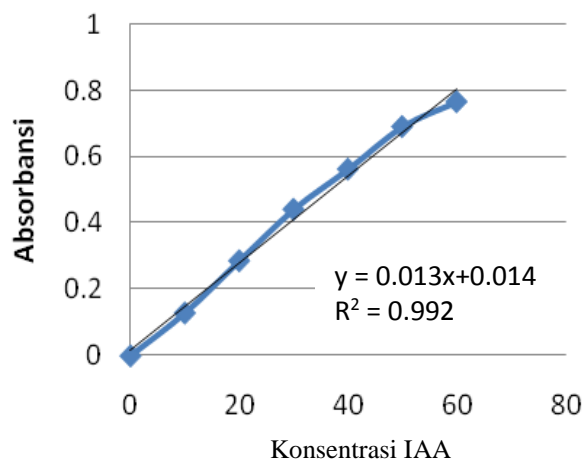
ppm. Perbandingan kultur *Bacillus sp.* dengan standar IAA sintetis dapat dilihat pada Gambar 1. Sampel menunjukkan reaksi positif yaitu mampu menghasilkan IAA secara kualitatif dengan melihat parameter perubahan warna menjadi merah muda. Warna merah muda yang berasal dari sampel mengindikasikan bahwa *Bacillus sp.* mampu menghasilkan IAA. Reaksi Fe yang berasal dari reagen Salkowsky dengan IAA akan membentuk senyawa kompleks. Interaksi kedua senyawa tersebut akan terlihat perubahan warna menjadi merah muda. Semakin tinggi kandungan IAA yang dihasilkan maka perubahan warna akan semakin pekat. Perubahan warna secara bertingkat terjadi pada standar IAA sintetis yang digunakan (Gambar 1a) dan sampel menunjukkan reaksi positif (1b).



**Gambar 1.** Pengukuran konsentrasi IAA secara kualitatif menggunakan metode kolorimetri. Ket. (a) Konsentrasi standar IAA sintetis (0-60 ppm), (b) Sampel kultur *Bacillus sp.*

Hasil analisis reaksi dari kultur diambil supernatan bakteri dan direaksikan dengan reagen *Salkowsky*. Pembuatan kurva standar IAA bertujuan memperoleh persamaan regresi untuk perhitungan konsentrasi IAA sampel. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri panjang gelombang 520 nm. Hasil pengukuran diolah menjadi grafik seperti pada Gambar 2.

Persamaan regresi terlihat pada (Gambar 2), dimana  $y = 0.013x + 0.014$  dan nilai regresinya adalah 0.992. Persamaan regresi diperoleh dari nilai absorbansi IAA standar dan sampel seperti disajikan pada Tabel 1



**Gambar 2.** Kurva standar IAA

**Tabel 1.** Nilai absorbansi IAA standar dan sampel

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi $\lambda=520$ nm	Absorbansi Akhir
0	0.009	0
10	0.138	0.129
20	0.295	0.286
30	0.450	0.441
40	0.571	0.562
50	0.699	0.690
60	0.774	0.765
Sampel	0.550	0.541

Hasil pengukuran absorbansi sampel yaitu 0,541 sebagai nilai y dan dikalkulasi ke dalam persamaan regresi untuk mencari nilai x. Nilai x adalah kadar IAA yang dihasilkan oleh sampel. Sampel *Bacillus* sp. yang diukur memiliki kandungan IAA sebesar 39,92 ppm. Dilihat dari Tabel 1 absorbansi sampel sama dengan absorbansi IAA standar yaitu 0,562 dengan nilai IAA sebesar 42 ppm.

## PEMBAHASAN

Pengukuran *Indole Acetic acid* (IAA) dari sampel *Bacillus* sp. diperoleh sebesar 39,92 ppm dengan menambahkan L-triptofan. Penambahan triptofan mempengaruhi IAA eksogen yang dihasilkan oleh bakteri. Hal ini dikarenakan triptofan merupakan prekursor yang berperan dalam biosintesis IAA. Pada bakteri, senyawa IAA dihasilkan melalui lintasan IPyA, proses sintesis IAA diubah dari L-Trp dengan melibatkan enzim seperti enzim Trp transaminase yang akan mengakumulasi L-Trp menjadi asam indol piruvat yang akan diubah menjadi IAA

(Patten & Glick 2002); (Ljung, 2013). Ditambahkan Spaepen *et al.*, (2007); Spaepen & Vanderleyden (2011) terdapat jalur sintesis IAA pada bakteri melalui jalur triptofan yaitu *Indole-3-acetamide pathway* (IAM) dengan dua tahapan. Tahap Pertama dikonversi IAM oleh enzim tryptophan-2-monooxygenase (IaaM), yang dikodekan oleh gen *iaaM*. Pada tahap kedua IAM diubah menjadi IAA oleh IAM hidrolase (IaaH) yang dikodekan oleh gen *iaaH*.

IAA yang diperoleh dari sampel penelitian merupakan kalibrasi dari absorbansi yang diukur dan dibandingkan dengan absorbansi IAA standar. IAA standar yang digunakan adalah IAA sintetik. Kadar IAA yang terdapat dalam kultur *Bacillus* sp. sebesar 39,92 ppm tergolong cukup tinggi. Hal tersebut ditunjukkan nilai IAA sama dengan kadar IAA sintetik pada konsentrasi 40 ppm. Pengukuran IAA dari sampel diperoleh dari kultur *Bacillus* sp. berumur 24 jam dengan *optical density* (OD) mencapai  $10^8$  sel/ml. Kepadatan sel bakteri tersebut berada pada fase stasioner. Memasuki fase stasioner, nutrisi di dalam medium mulai berkurang dan menyebabkan bakteri memproduksi IAA pada fase ini. Hal ini sesuai dengan Wahyudi *et al.*, (2011) mengatakan bahwa produksi IAA dihasilkan pada fase stasioner.

Kandungan IAA dari sampel diduga dapat memberikan pengaruh terhadap tanaman. Hal tersebut sesuai dengan Astriani *et al.*, (2016) yang melaporkan rhizobakteria *Bacillus thuringiensis* menghasilkan IAA sebesar 3,99ppm mampu memacu pemanjangan akar pada benih kelapa sawit. Ditambahkan Lwin *et al.*, (2012) melaporkan *Bacillus* spp. memiliki kisaran IAA mulai dari 53,1 ppm sampai optimal 71,1 ppm mampu memacu pertumbuhan kedelai. Penelitian Wahyudi *et al.*, (2011) menambahkan *Bacillus* sp. dengan konsentrasi IAA yang dihasilkan sebesar 15,20 mg/L mampu meningkatkan pertumbuhan tunas, akar primer, dan akar lateral secara langsung dalam merangsang sel tanaman.

Pengaruh IAA yang tinggi tidak selalu memberikan pengaruh baik bagi pertumbuhan

tanaman. Dilaporkan Aryanta (2004), bahwa konsentrasi IAA yang tinggi dapat mempengaruhi penghambatan perpanjangan sel. Kandungan IAA dari kultur *Bacillus* sp. pada penelitian ini memiliki potensi untuk dapat diaplikasikan sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman. Dilaporkan Pattern & Glick, (2002) bahwa konsentrasi IAA yang rendah 10<sup>-9</sup> dan 10<sup>-12</sup> M berpengaruh pada pertumbuhan akar primer dan konsentrasi IAA yang tinggi menghambat pertumbuhan akar.

Konsentrasi IAA yang dihasilkan mempunyai kisaran dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman. IAA tergolong auksin alami yang memiliki komponen cincin indol dan berperan memainkan peranan dalam menstimulasi pembelahan sel dan pemanjangan sel (Apine & Jadhav, 2010). IAA eksogen yang disekresikan oleh bakteri dapat meningkatkan pertumbuhan akar secara langsung dengan merangsang pemanjangan sel tumbuhan. Senyawa IAA mempengaruhi aktivitas ACC deaminase bakteri. Stimulasi akar adventif dan lateral dipengaruhi oleh *ethylene* yang disebabkan oleh IAA. Sehingga kenaikan jumlah akar akan berkorelasi dengan produksi etilen. Ketika produksi etilen yang dihasilkan tinggi maka akan mempengaruhi pertumbuhan. Terbukti ketika kadar IAA eksogen tinggi maka akan menghambat pertumbuhan elongasi pada akar (Patten & Glick, 2002).

## KESIMPULAN

Kandungan IAA dari *Bacillus* sp dengan metode kolorimetri diperoleh sebesar 39,92ppm dengan penambahan L-triptopan. Hal ini mengindikasikan *Bacillus* sp memiliki potensi yang cukup tinggi sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman.

## REFERENSI

Akbari, G.A., Arab, H.A., Alikhani, I., & Arzanesh. 2007. Isolation and Selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. *World Journal of Agricultural Sciences*. Vol 3(4): 523-529.

Aryantha IN, Lestari DP, Pangesti NPD. 2004. Potensi isolat bakteri penghasil IAA dalam peningkatan pertumbuhan kecambah kacang hijau pada kondisi hidroponik. *J Mikrobiol Indones*. 9(2):43-46

Astriani, M., Mubarik, N.R., & Tjahjoleksono, A. 2016. Selection of bacteria producing indole-3-acetic acid and its application on oil palm seedlings (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Malaysian Journal of Microbiology*. Vol 12 (2): 147-154.

Apine, Q. A., & Jadhav, J.P. 2010. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* PVM. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 110: 1235-1244.

Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezael, M.R., Borriss, R. and Wiren, N.V. 2010. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J.Plant Nutr. Soil Sci*, 000: 1-9.

Geisseler, D. and Scow, K.M. 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganism-A Review. *Soil Biology & Biochemistry*, 75: 54-63.

Ljung, K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140 (5): 943-950.

Lynch, J. M. 1985. Origin, nature and biological of aliphatic substances and growth hormones found in soil. *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Vol 16, 151-174. doi: 10.1007/978-94-009-5105-1\_5

Lwin, K.M., Moe, M.M., Tar, T., & Aung, Z.M. 2012. Isolation of plant hormone indole-3-acetic acid producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*. Vol 16(5): 138-144.

Patten, C.L., & Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8): 3795-3801. doi: 10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.

Shahab, S., Ahmed, N., & Khan, N. S. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research*. Vol 4(11): 1312-1316.

Spaepen, S., Vanderleyden J., & Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*. Vol 31(4): 425-448.

Spaepen, S. & Vanderleyden. 2011. Auxin and plant-microbe Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Vol 3(4): 1-13. doi: 10.1101/cshperspect.a001438

Tahir, H.A.S., Gu,Q., Wu, H., Raza., Hanif, A., Wu, L., Colman, M.V. and Gao, X. 2017. Plant Growth

- Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front Microbiol*, 8: 1-11.
- Tahir, M., Mirza, M.S., Hameed, S., Dimitrov., M.R. & Smidt, H. 2015. Cultivation-based and molecular assesment of bacterial diversity in the rhizosheath of wheat under different crop rotations. *Plos One*. Vol 10(6): 28.
- Tsavkelova, E.A. Klimova, S.Y., Cherdyntseva. & Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review, *applied biochemistry and microbiology*. Vol 42(2): 117-126
- Vessey, K.J. 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizer. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., Nawangsih, A.A. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. Vol 3: 34-40.
- Zhao, Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman, J.R., Cohen J.D. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*. Vol 291(5502): 306-309.