

BIOPROSPEKSI RHIZOBAKTERI PENGHASIL IAA (*Indole Acetic Acid*) DARI TANAMAN JAGUNG (*Zea mays*L.) DI AREA PERTANIAN SEMI ORGANIK DESA BATURKEC. GETASAN KAB. SEMARANG

Khoirul Huda, Anto Budiharjo¹, Budi Raharjo¹

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang,
Semarang 50275 Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690
email: suksesirul@yahoo.com

ABSTRACT

Microorganisms in nature have a rich diversity and have an important role in human lives, especially in agriculture. Some types of bacteria live in the area of plant roots called rhizobacteria. Some rhizobacteria has the ability to stimulate the growth of crops such as produce IAA (*Indole Acetic Acid*). This study aims to find rhizobacteria in maize (*Zea mays* L.) which has the ability to produce IAA (*Indole Acetic Acid*) that can be used as a reference in rhizobacteria resource utilization to increase agricultural production in a sustainable and environmentally friendly. This study was conducted with bacterial isolation, characterization of bacterial isolates in colony and cell morphology, The test of rhizobacteria's ability to produce IAA (*Indole Acetic Acid*), the molecular identification of the isolates were able to produce IAA rhizobacteria and confirmatory tests. The results of isolation obtained seventeen isolates of rhizobacteria where there is a one of isolate (J.6) is able to produce 20.5 ppm IAA in TSB (Tryptic Soy Broth) supplemented with 100 ppm of L-tryptophan. The Result of the molecular identification show that isolate which has the ability to produce IAA has 97% similarity with *Bacillus safensis* Strain A-2. Isolate "J.6" have the same characteristic features with *Bacillus safensis*. They are a gram-positive, rod-shaped, capable of forming endospores, motile, catalase positive, capable of fermenting glucose and hydrolyzing a starch.

Key word : Rhizobacteria, Indole Acetic Acid, Bacillus safensis Strain A-2

ABSTRAK

Mikroorganisme di alam memiliki keanekaragaman yang berlimpah dan memiliki peranan yang penting dalam kehidupan manusia, khususnya dalam bidang pertanian. Beberapa jenis bakteri hidup di area perakaran tanaman yang disebut dengan rhizobakteri. Beberapa rhizobakteri mempunyai kemampuan dalam memacu pertumbuhan tanaman seperti menghasilkan IAA (*Indole Acetic Acid*). Penelitian ini bertujuan untuk mencari rhizobakteri pada tanaman jagung (*Zea mays* L.) yang mempunyai kemampuan dalam menghasilkan IAA (*Indole Acetic Acid*) sehingga bisa dijadikan sebagai acuan dalam pemanfaatan sumber daya rhizobakteri untuk meningkatkan produksi pertanian secara berkelanjutan dan ramah lingkungan. Penelitian ini dilakukan dengan isolasi bakteri, karakterisasi isolat bakteri secara morfologi koloni dan sel, uji kemampuan rhizobakteri dalam menghasilkan IAA (*Indole Acetic Acid*), identifikasi secara molekuler isolat rhizobakteri yang mampu menghasilkan IAA dan uji konfirmasi. Hasil isolasi diperoleh tujuh belas isolat rhizobakteri dimana terdapat satu isolat rhizobakteri (J.6) yang mampu menghasilkan 20,5 ppm IAA pada medium TSB (*Tryptic Soy Broth*) yang disuplementasi dengan 100 ppm L-tryptofan. Hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan isolat yang mampu menghasilkan IAA tersebut mempunyai kemiripan 97% dengan *Bacillus safensis* Strain A-2. Isolat J.6 mempunyai ciri karakteristik yang sama dengan *Bacillus safensis* yaitu merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, mampu membentuk endospora, bersifat motil, katalase positif, mampu memfermentasi glukosa sertamenghidrolisis pati.

Kata kunci : Rhizobakteri, Indole Acetic Acid, Bacillus safensis Strain A-2

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara megadiversitas yang sangat kaya akan

keanekaragaman hayati, termasuk keanekaragaman jenis mikroorganisme. Mikroorganisme di alam memiliki keanekaragaman yang berlimpah dan

memiliki peranan yang penting dalam kehidupan manusia, khususnya dalam bidang pertanian.

Berbagai spesies bakteri hidup di area perakaran tanaman yang disebut sebagai rhizobakteri dan diantaranya mempunyai kemampuan dalam memacu pertumbuhan tanaman disebut PGPR. PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) merupakan mikroba yang mempunyai peranan menambat N₂; menghasilkan hormon tumbuh (seperti: IAA, giberelin, sitokinin, etilen); menekan penyakit tanaman asal tanah dengan memproduksi siderofor, glukonase, kitinase, sianida; dan melarutkan hara lainnya (Surtiningsih dan Mariam, 2011).

Aryantha, dkk. (2004) dan Agustian, dkk. (2010) menyebutkan bahwa IAA (*Indole Acetic Acid*) merupakan hormon kunci berbagai aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman sehingga alasan sintesisnya oleh jenis bakteri tertentu merupakan salah satu alasan terjadinya peningkatan pertumbuhan tanaman. Hormon IAA merupakan senyawa yang dalam jumlah sedikit tetapi dapat berpengaruh besar terhadap pertumbuhan dan produksi tanaman. IAA (*Indole Acetic Acid*) berfungsi mendorong pemanjangan sel serta menambah kemampuan sel dalam menyerap air, sehingga dapat meningkatkan potensial air jaringan akibatnya sel akan mengalami pemanjangan.

Mengacu pada konsep sistem pertanian organik, prospek pemanfaatan mikroorganisme sebagai *biostimulants*, *biofertilizers* dan *bioprotectants* menjadi penting untuk dikaji. Bioprospeksi rhizobakteri yang meliputi serangkaian kegiatan isolasi, koleksi dan pemanfaatan sumber daya genetik penting untuk dilakukan guna mendapatkan produk alamiah yang mampu membangun pertanian Indonesia.

METODOLOGI

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2014 sampai Juni 2014 di Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Sampel tanah pertanian organik, akuades, *Nutrient Broth* (NB), *Tryptic Soy Agar*

(TSA), *Tryptic Soybroth* (TSB), H₂O₂ 3 %, larutan Hucker's kristal violet (gram A), larutan mordant lugol's iodine (gram B), larutan alkohol acetone (Gram C), larutan cat safralin (gram D), reagen Salkowski, kaca objek, gelas penutup, minyak imersi, *DNA marker*, *etidium bromide* (*EtBr*), agarosa 0,8 %, alkohol, etanol, L-Triptofan, membran filter 0,45 µm, kapas, kasa, spiritus, tissue dan aluminium foil.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, tabung durham, rak tabung, inkubator, autoklaf, *laminar air flow*, jarum ose, penangas air, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, mikro pipet, *rotary shaker*, *vortex*, *tip*, cuvet, bunsen, mikro pipet, mikroskop, *eppendorf*, *polymerase chain reaction* (PCR), elektroforesis, nampan, nanospektrofotomete, sentrifuge, mikrosentrifuge, neraca ohaus, milipore filter, dan *uv transilluminator*.

Cara Kerja

Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil berupa tanah di sekitar perakaran jagung. Pengambilan sampel dilakukan pada 3 titik dari rhizosfer dengan kedalaman 10-15 cm. Pengukuran temperatur, ketinggian lokasi sampel, kelembaban dan pH tanah pada titik pengambilan sampel tanah rhizosfer. Sampel tanah diperoleh dari pertanian organik Dusun Selongisor Desa Batur Kec. Getasan Kabupaten Semarang.

Isolasi Rhizobakteri

Isolasi rhizobakter menggunakan metode Ammounh *et al.* (2010) yang dimodifikasi. Sampel yang berupa 5 g tanah yang melekat dipermukaan akar dimasukkan dalam labu erlemeyer berisi 45 ml aquades steril dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 4 jam kemudian dipanaskan hingga suhu 80°C selama 30 menit. Suspensi yang diperoleh diencerkan kembali hingga didapat pengenceran 10⁻⁶. Pengambilan 100 µL dari suspensi pada tingkat 10⁻⁴, 10⁻⁵, dan 10⁻⁶ dalam cawan petri steril berisi medium TSA. Kultur diinkubasikan pada suhu ruang sampai tampak pertumbuhan koloni-koloni pada permukaan medium selama 48 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dipisahkan pada cawan petri yang berbeda yang berisi medium TSA berdasarkan perbedaan morfologi koloni sehingga didapat kultur murni. Kultur murni yang telah

didapatkan dipindahkan ke agar miring sebagai kultur kerja.

Karakterisasi Morfologi Koloni dan Sel

Karakterisasi morfologi koloni rhizobakteri dilakukan berdasarkan petunjuk Cappucino & Sherman (1987) yaitu pengamatan koloni rhizobakteri yang meliputi warna koloni, ukuran koloni, tepian koloni, bentuk koloni, dan elevasi.

Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan gram (Cappucino & Sherman, 1987). Pewarnaan gram dilakukan dengan membersihkan gelas benda dengan alkohol sehingga bebas lemak, kemudian dipanggang di atas nyala bunsen. Preparat apusan bakteri dibuat dengan mengambil secara aseptik 1 ose suspensi biakan bakteri lalu diratakan di atas permukaan gelas benda kira-kira seluas 1 cm². Olesan bakteri diberi 2-3 tetes pewarna Kristal violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan bakteri digenangi dengan 2 tetes larutan lugol iodine (gram B), dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan dicuci dengan larutan alkohol aseton (gram C) selama 30 detik. Zat pewarna berlebih dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan diberi cat safranin (gram D) selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran kuat (1000x) menggunakan minyak emersi. Bakteri gram negatif akan berwarna merah, sedangkan gram positif akan berwarna ungu.

Uji Kemampuan Rhizobakteri dalam Menghasilkan IAA

Pengukuran kemampuan rhizobakteri dalam menghasilkan IAA menggunakan metode Gordon dan Weber (Miliute dan Buzaite, 2011) dengan menggunakan reagen ferri klorida-asam perklorat (FeCl₃-HClO₄) 1 ml isolat bakteri dinokulasikan pada 20 ml medium TSB yang diperkaya dengan 100 ppm L-triptofan diinkubasi selama 2 hari dalam kondisi dishaker 120 rpm. 1,5 ml kultur bakteri selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan reagen salkowski dengan perbandingan (1:2) dan diinkubasi selama 25 menit pada suhu kamar. Supernatan yang mengandung IAA akan berubah

warna dari kuning menjadi menjadi merah. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 530 nm. Jumlah IAA dihitung dengan menggunakan kurva standar.

Identifikasi Molekuler

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Chelex (Walsh *et al.*, 2013). Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan 3 ose kultur bakteri ke dalam mikrotube yang telah berisi 100 µL ddH₂O kemudian ditambah 1 ml saponin 0,5 % dalam PBS 1 X kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4 °C. Setelah 24 jam, sel bakteri yang telah direndam dalam saponin kemudian disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian natan ditambah 100 µL ddH₂O dan 50 µL 20% chelex secara aseptis. Suspensi dididihkan selama 10 menit dan divorteks setiap 5 menit. Suspensi kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang mengandung DNA diambil dan dipindahkan pada eppendorf bersih. Kuantitas DNA hasil ekstraksi diukur dengan menggunakan nanospektrofotometer. Supernatan merupakan DNA yang siap digunakan untuk proses PCR.

Amplifikasi PCR dengan 16S rRNA menggunakan metode Lee *et al.* (2006). Volume formula yang diamplifikasi PCR adalah sebesar 50 µL yang terdiri dari 3 µL DNA, 1,5 µL primer 27F, 1,5 µL primer 1492R, 25 µL kit promega dan 19 µL ddH₂O. Perlakuan temperatur yang digunakan pada PCR ini adalah : pradenaturasi yaitu memanaskan DNA supaya untai ganda DNA terpisah pada 95°C selama 3 menit, kemudian 30 siklus (denaturasi pada 95°C selama 1 menit, annealing pada 55 °C selama 1 menit, dan extension pada 72 °C selama 1 menit), final extension pada 72 °C selama 7 menit. Primer yang digunakan untuk PCR 16S rRNA adalah primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Visualisasi produk PCR 16S rRNA dilakukan menggunakan analisis elektroforesis dengan cara memasukkan 5 µl produk PCR dengan ditambahkan 1 µl *loading dye* ke dalam sumuran gel agarose 0,8 % yang telah direndam larutan buffer TAE 0,5 x, gel kemudian dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 V selama 30 menit. Gel kemudian direndam ethidium bromida selama 20 menit untuk

mewarnai pita DNA yang terperangkap pada gel. Terakhir, pita hasil PCR dilihat menggunakan alat *Gel Doc*.

Produk PCR yang diperoleh diuji untuk penentuan sekuens 16S rRNA. Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan menyajajarkan urutan nukleotida dengan sekuens yang diduga terdapat dalam *genbank* menggunakan program MEGA 5, kemudian daerah yang memiliki kesamaan urutan sekuens dianalisis kembali menggunakan penyajajaran yang terdapat dalam fasilitas penyajajaran *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di *gen bank*.

Uji Konfirmasi Karakteristik Isolat Penghasil IAA

Isolat penghasil IAA yang telah diidentifikasi secara molekuler, kemudian diuji beberapa karakteristik yang dimiliki. Uji yang dilakukan meliputi uji motilitas, uji katalase, uji fermentasi karbohidrat, uji hidrolisis pati, dan pewarnaan endospora.

Uji motilitas dilakukan dengan diinokulasikannya ujung ose lurus yang mengandung isolat bakteri kedalam medium TSB yang mengandung agar 0,5 % (agar lunak). Selanjutnya diinkubasikan pada suhu ruang selama dua hari. Bila pertumbuhan menyebar, maka bakteri tersebut bergerak atau motil, dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar, hanya berupa garis saja, maka bakteri tersebut bersifat tidak bergerak (non motil) (Savitri, 2006).

Uji katalase diamati dengan mengambil sedikit biakan bakteri yang diletakan pada gelas obyek kemudian diteteskan beberapa tetes larutan H_2O_2 3% diatas gelas obyek tersebut. Hasil positif pada uji katalase ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara (O_2) di dalam larutan H_2O_2 berarti bakteri memiliki enzim katalase (Cappucino & Sherman, 1987).

Pengujian fermentasi karbohidrat dapat diamati menggunakan *phenol red indicator*. Uji fermentasi karbohidrat dengan menggunakan medium glukosa 0,1 %. 5 ml medium *glucose broth* ditempatkan dalam tabung reaksi dan didalamnya terdapat tabung durham. Bakteri yang diuji, diinokulasikan pada medium tersebut, kemudian diinkubasi pada temperatur yang sesuai selama 48 jam. Bakteri yang mampu memfermentasi dengan menghasilkan asam ditunjukkan dengan perubahan warna medium setelah diinkubasi menjadi kuning dan adanya gas

dapat dilihat dalam tabung durham (Pyar & Peh, 2014).

Uji hidrolisis pati dilakukan dengan menggunakan medium agar pati. Medium dalam cawan petri yang telah diinokulasikan isolat bakteri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan iodium/lugol diteteskan disekitar koloni. Terbentuknya zona bening disekitar koloni menandakan terkadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase (Cappuccino & Sherman, 1987).

Pengamatan spora menggunakan metode Klein (Bonang dan Koeswardono, 1982). Isolat bakteri dibuat suspensi sehingga menyerupai air susu. Suspensi kemudian ditambahkan dengan fushin karbol dalam jumlah yang sama banyaknya dengan suspensi. Campuran suspensi dipanaskan dengan api selama 6 menit kemudian dibuat sediaan. Sediaan dikeringanginkan dan direkatkan. Sediaan dicelupkan ke dalam larutan H_2SO_4 1% selama 2-3 detik kemudian dicuci dengan air. Sediaan ditetesi dengan larutan biru metilen selama 2-4 menitkemudian dicuci dengan air dan dikeringkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diperoleh 17 isolat rhizobakteri dari rhizosfer tanaman jagung di area pertanian semi organik Desa Batur Kec. Getasan Kab. Semarang. Isolat yang diperoleh dikarakterisasi berdasarkan kenampakan morfologi koloni dan sel (Lihat Tabel 1). Semua isolat yang diperoleh termasuk kelompok bakteri gram positif dan berbentuk batang. Isolat yang diperoleh kebanyakan berwarna putih dengan tingkat kecerahan yang berbeda-beda dan berbetuk *circuler*.

Semua isolat yang diperoleh diuji kemampuannya dalam menghasilkan IAA (*Indole Acetic Acid*) dengan menginokulasikan 1 ml kultur isolat rhizobakteri pada medium TSB yang diperkaya dengan 100 ppm L-triptofan. Hasil uji menunjukkan isolat J.6 mampu menghasilkan IAA (Lihat Tabel 2). Isolat J.6 terbukti mampu menghasilkan IAA terlihat dari adanya perubahan warna dari kuning menjadi merah muda pada sampel yang telah ditambah reagen salkowski (Gambar 1).

Kemampuan isolat J.6 dalam menghasilkan IAA dihitung dengan menggunakan kurva standar yang sudah dibuat. Isolat J.6 mampu menghasilkan 20,1 ppm IAA pada medium TSB yang diperkaya dengan 100 pmm L-

triptofan yang diinkubasi selama 2 hari. Kemampuan isolat J.6 dalam menghasilkan IAA termasuk dalam katagori tinggi. Menurut Widyawati (2008) bakteri masuk dalam katagori lemah dalam menghasilkan IAA apabila IAA yang dihasilkan kurang 10 ppm. Bakteri yang mampu menghasilkan IAA antara 10-20 ppm dikategorikan sedang dan bakteri masuk dalam katagori tinggi kemampuannya dalam menghasilkan IAA apabila yang dihasilkan lebih dari 20 ppm.

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan IAA berbeda-beda, hal itu menurut Widyawati (2008) disebabkan karena adanya perbedaan jalur atau mekanisme dalam menghasilkan IAA. Menurut Kawaguchi dan Syono (1996) dan Speapen dan Vanderleyden (2010) biosintesis IAA oleh prokariot bisa terjadi melalui dua jalur yaitu *Indole-3-Acetamide Pathway* (IAM) dan *Indole-3-Pyruvate Pathway* (IPyA).

Tabel 1. Morfologi koloni dan sel rhizobakteri dari tanaman jagung

Isolat	Ukuran	Warna	Bentuk	Margin	Elevasi	Gram	Bentuk Sel
j.1	kecil	putih-krem	<i>circuler</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.2	sedang	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>	positif	basil
j.3	besar	putih	<i>filamentous</i>	<i>filiform</i>	<i>flat</i>	positif	basil
j.4	sedang	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.5	sedang	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.6	kecil	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.7	besar	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.8	kecil	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.9	point	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.10	sedang	putih	<i>circulat</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.11	besar	putih	<i>rhizoid</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.12	kecil	orange	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.13	besar	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.14	besar	putih	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.15	besar	putih	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.16	point	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil
j.17	sedang	putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>	positif	basil

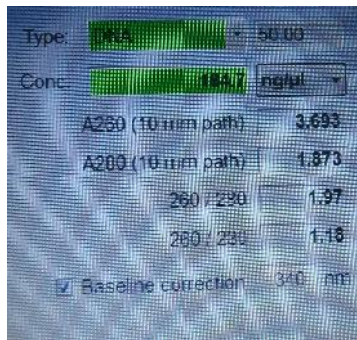
Biosintesis IAA pada bakteri yang menguntungkan tanaman seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, dan *Enterobacter cloacae* melalui jalur *Indole-3-Pyruvate Pathway* (IPA). Biosintesis IAA pada jalur *Indole-3-Pyruvate Pathway* (IPA) dipengaruhi oleh ekspresi gen *ipdc* sedangkan biosintesis IAA pada jalur *Indole-3-Acetamide Pathway* (IAM) dipengaruhi oleh ekspresi gen *iaaM* dan *iaaH* dimana pada *Agrobacterium tumifaciens* gen tersebut berada pada daerah T-DNA plasmid pTi bersama dengan gen *ipt*.



Gambar 1. Hasil Uji Kualitatif IAA (K(-) = kontrol negatif, J.6 = isolat J.6, K(+)= kontrol positif).

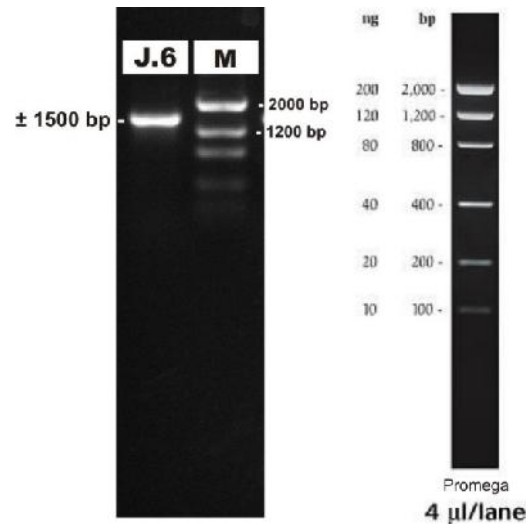
Menurut Widyawati (2008) konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh bakteri juga tergantung kepada aktivitas dan jumlah sel, ketersediaan nutrisi dan substrat L-triptofan dalam media. Menurut Sofyan (2013) semakin banyak penambahan substrat L-triptofan maka IAA yang dihasilkan bakteri akan meningkat.

Isolat J.6 yang mempunyai kemampuan dalam menghasilkan IAA (*Indole Acetic Acid*) disolasi DNA nya menggunakan larutan chelex 20%. DNA murni yang diperoleh diuji secara kuantitatif menggunakan nanospektrofotometer sehingga diketahui bahwa DNA isolat J.6 yang diperoleh adalah $184,7 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ dengan nilai kemurnian 1,97 (Lihat Gambar 2). Menurut Fatchiyah, dkk. (2011) nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 dimana hal itu bisa diperoleh dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi nilai absorbansi 280 nm ($\text{A}260/\text{A}280$). Kemurnian DNA hasil ekstraksi sangat penting untuk tahap selanjutnya yaitu tahap PCR karena menurut Fatchiyah, dkk. (2011) kontaminan pada DNA akan menghambat kinerja *taq* polymerase.



Gambar 2. Uji Kuantitatif DNA isolat J.6 dengan Nanospektrofotometer DNA murni yang diperoleh kemudian di amplifikasi menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Sekuens yang digandakan adalah 16S rRNA dengan menggunakan primer universal 27F dan 1492R. Menurut Pangastuti (2006) daerah 16S rRNA banyak digunakan dalam filogenetika, klasifikasi, dan identifikasi untuk bakteri karena sifat keberadaanya yang *ubikuitas* dengan fungsi yang identik pada semua bakteri. Amplifikasi PCR DNA isolat J.6 menggunakan 30 siklus yang meliputi proses pradenaturasi, denaturasi, annealing, ekstensi dan praekstensi. Menurut Fatchiyah, dkk. (2011) dasar siklus PCR ada 30-35 siklus sedangkan

jumlah siklus diatas 35 siklus tidak memberikan efek yang postif. Produk PCR kemudian dielektroforesis dan hasilnya divisualisasi dengan menggunakan *Gel Doc* sehingga dapat diketahui bahwa fragmen DNA isolat berukuran sebesar $\pm 1500 \text{ bp}$ yang ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi hasil amplifikasi sekuens 16S rRNA isoalat J.6 pada konsentrasi gel agarose 0,8 % (M=marker, J.6=isolat J.6)

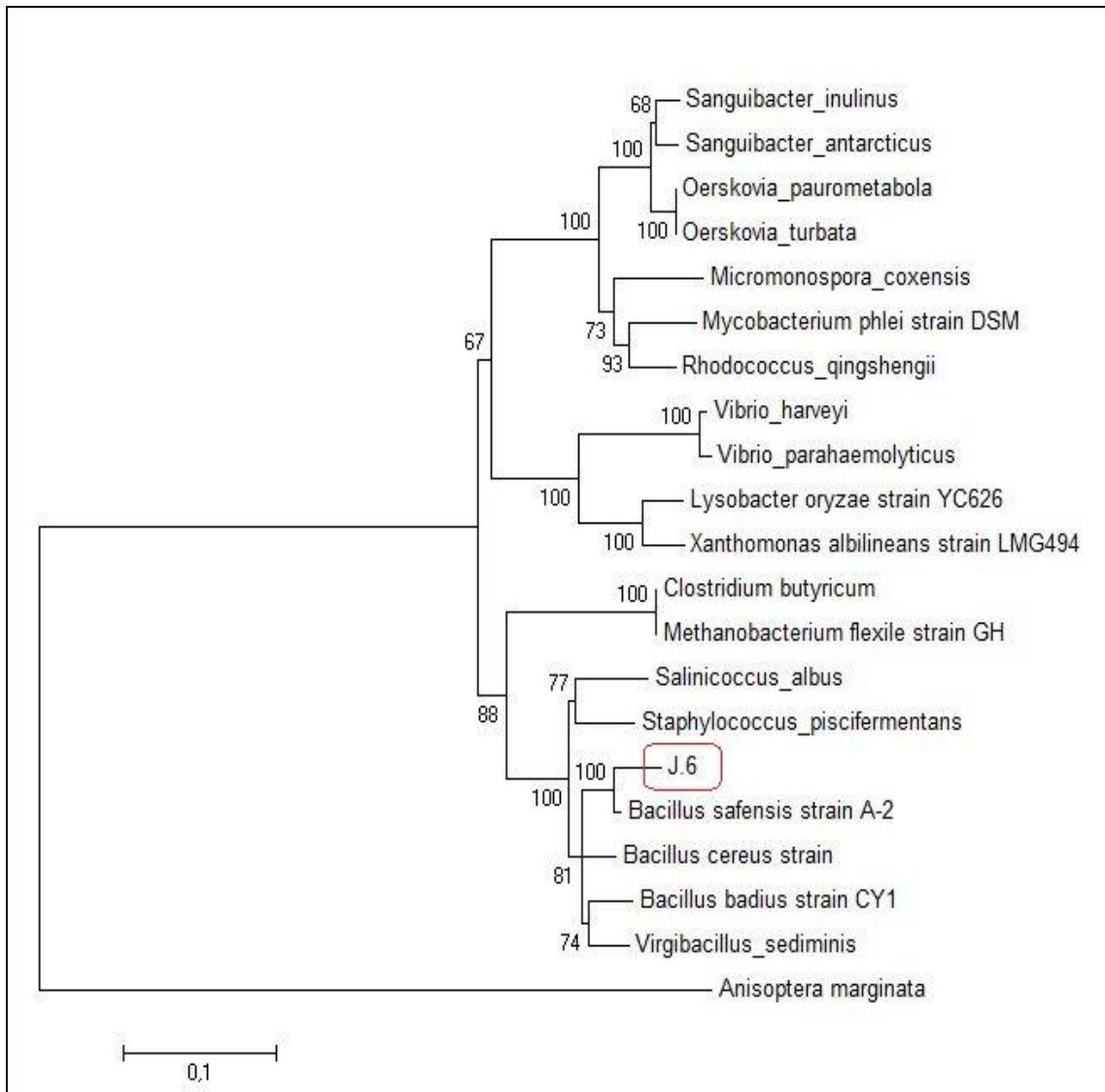
Produk DNA hasil PCR selanjutnya dilakukan *sequencing* untuk menentukan urutan nekleotida. Hasil sekuens berupa susunan basa sebanyak 1426 nukleotida. Hasil analisis sekuen parsial gen 16 S rRNA dengan BLAST-N menunjukkan bahwa J.6 memiliki similaritas 97 % dengan *Bacillus safensis* Strain A-2. Menurut Drancourt *et al.* (2000) identifikasi pada tingkat spesies ditetapkan dari similaritas sekuen 16S rRNA 99% dengan sekuen yang ada pada *Gen Bank*, identifikasi pada tingkat genus dengan similaritas 97% dan identifikasi baru ditetapkan dengan similaritas yang lebih rendah dari 97 %. Setelah sekuens diurutkan menggunakan program *clustalW multiple alignment* maka dilanjutkan dengan

membuat pohon filogeni dengan menggunakan program MEGA.5 sehingga didapat pohon filogeni sebagaimana Gambar 4.

Pohon filogenik menggunakan data sekuen *GenBank* sebagai pembandingan menunjukkan bahwa isolat J.6 merupakan kelompok *Bacillus* dan memiliki similaritas 97 % dengan *Bacillus safensis* strain A-2. Kothari *et al.* (2013) mengisolasi *Bacillus safensis* dari rizosfer tanaman jinten putih (*Cuminum cyminum*) di India dan Singh *et al.* (2013) mengisolasi *Bacillus safensis* dari umbi akar tanaman Asparagus di kebun botani Universitas Punjabi India. *Bacillus safensis* menurut Kothari *et al.* (2013) dan

Kumar *et al.* (2014) merupakan jenis rhizobakteri yang tahan terhadap salinitas tinggi, radiasi sinar UV dan radiasi sinar gamma. Kothari *et al.* (2013) menyebutkan bahwa *Bacillus safensis* merupakan jenis bakteri yang kuat dalam menghasilkan hormon tanaman dan merupakan jenis PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) yang mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman setelah mengkolonisasi akar.

Karakteristik isolat J.6 dikonfirmasi dengan beberapa karakteristik *Bacillus safensis*. Pembandingan karakteristik *Bacillus safensis* dan isolat J.6 dilakukan berdasarkan



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasarkan perbandingan sekuens16S rRNA menggunakan analisis *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 100

hasil penelitian Satomi, *et al.* (2006) dan Kothari, *et al.* (2013). Isolat J.6 mempunyai karakteristik yang sama dengan *Bacillus safensis* (Tabel 2). Satomi *et al.* (2006) menyebutkan bahwa *Bacillus safensis* merupakan berbentuk batang dan termasuk dalam kelompok bakteri gram positif. *Bacillus safensis* bersifat motil dan mampu membentuk endospora. *Bacillus safensis* mampu menghidrolisis pati dan termasuk dalam kelompok bakteri

katalase positif. *Bacillus safensis* mampu menghasilkan asam dari medium glucose broth tapi tidak mampu menghasilkan gas pada medium yang sama. Menurut Kothari *et al.* (2013) *Bacillus safensis* merupakan kelompok bakteri yang berpotensi sebagai PGPR dan kuat dalam menghasilkan fitohormon.

Tabel 2. Karakteristik isolat J.6 dibandingkan dengan *Bacillus safensis*

Karakteristik yang diamati	Sifat J.6	<i>Bacillus safensis</i> (Satomi <i>et al.</i> , 2006 dan Kothari <i>et al.</i> , 2013)
Pewarnaan Gram	+	+
Bentuk	Batang	Batang
Motiltas	+	+
Membentuk Endospora	+	+
Fermentasi glukosa		
➤ Terbentuk Asam	+	+
➤ Terbentuk Gas	(-)	(-)
Hidrolisis Pati	+	+
Katalase	+	+
Kemampuan Menghasilkan Fitohormon	+	+

Keterangan: tanda + berarti positif
tanda (-) berarti negatif

KESIMPULAN

Sebanyak 17 isolat bakteri telah berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman jagung (*Zea mays* L) pada area pertanian semi organik Desa Batur Kec. Getasan Kab. Semarang dan terdapat satu isolat bakteri (J.6) yang mempunyai kemampuan menghasilkan IAA (*Indole Acetic Acid*). Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat yang mampu menghasilkan IAA tersebut merupakan *Bacillus safensis* Strain A-2. Isolat J.6 mempunyai karakteristik yang sama dengan *Bacillus safensis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustian, Nuriyani, Lusi, M dan Oktanis, E. 2010. Rhizobakteria Penghasil Fitohormon IAA pada Rhizosfer Tumbuhan Semak Karamunting, Titonia, Dan Tanaman Pangan. *J. Solum*. 8 (1): 49-60.
- Ammounh, H., Muhanad, H., Emad, I., and Hayat, M. 2010. Isolation and Characterization of Native *Bacillus Thuringiensis* Isoalats From Syrian Soil and Testing of Their Insecticidal Activities Against Some Insect Pests. *Turk J Agric For*. 35 (2011) 421-431
- Aryantha, N.P., Dian, P.L. dan Nurmi, P.D.P. 2004. Potensi Isolat Penghasil IAA dalam Peningkatan Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau pada Kondisi Hidroponik. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 9(2): 43-46.
- Bonang, G dan E.S. Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. PT. Gramedia. Jakarta.
- Breed, R.S., E.G.D. Murray and Nathan, R.S. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Seventh Edition*. Baltimore, Williams & Wilkins Co. USA.
- Cappuccino, J. G and Sherman, N. 1987. *Microbiology a Laboratory Manual*. The Benjamin/cumming Publishing Company Inc. California.
- Drancourt, M., Claude, B., Antoine, C., Rolland, M., Jean, P.G., and Didier, R. 2011. 16 S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection Of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (10): 3623-2630.
- Fatchiyah, Arumningtyas, E.L., Widyarti, S., dan Rahayu, S., 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar dan Analisis*. Erlangga. Jakarta.

- Gordon, S.A and Robert, P.W.1950. Colorimetric Estimation of Indole Acetic Acid. *Plant Physiol.* 30(1): 192-195.
- Kawaguchi, M and K. Syono. 1996. The Excessive Production of Indole-3-acetic Acid and Its Significance in Studies of the Biosynthesis of This Regulator of Plant Growth and Development. *Plant Cell Physiol.* 37(8):1043-1048.
- Kothari, V.V., R. K. Kothari, C. R. Kothari, V. D. Bhatt, N. M. Nathani, P. G. Koringa, C. G. Joshi, B. R. M., and Vyas. 2013. Genome Sequence of Salt-Tolerant *Bacillus safensis* Strain VK, Isolated from Saline Desert Area of Gujarat, India. *Journal Genome Announcements.* 1 (5): 1-1.
- Kumar, D., Rajinder, P., and Vijay, K.G. 2014. Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from *Bacillus safensis* DVL-43. *International Journal of Biological*
- Lee, Y.K., Hyun, J.J., and Hong, K.L. 2006. Marine Bacteria Associated with the Korean Brown Alga, *Undaria pinnatifida*. *The Journal of Microbiology* 44(6): 694-698.
- Miliute, I., and Odeta, B. 2011. IAA Production and Other Plant Growth Promoting Traits of Endophytic Bacteria From Apple Tree. *Biologija.* 57(2): 98-102.
- Pangastuti, A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Jurnal Biodiversitas* (7) 3: 292-296
- Pyar, P and K.K. Peh. 2014. Characterization and Identification of *Lactobacillus acidophilus* Using Biolog Rapid Identification System. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(1):189-193.
- Satomi, M., Myron, T.D., and Kasthuri, V. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., Isolated From Spacecraft and Assembly-Facility Surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1735-1740.
- Savitri, S.D. 2006. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Halotoleran Pada Peda Ikan Kembung (*Rastrelliger* sp.). *Skripsi.* Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Singh, R.S., and Singh, R.P. 2014. Response Surface Optimization of Endoinulinase Reduction From a Cost Effective Substrate By *Bacillus safensis* 08 for Hydrolysis of Inulin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 1(1): 1-8.
- Sofyan, F.L. 2013. Kemampuan Isolat Bakteri Penghasil Indole Acetic Acid (IAA) dari Tanah Gambut Kabupaten Sampit Kalimantan Tengah. *Skripsi.* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Undip, Semarang.
- Spaepen, S and J. Vanderlaeyden. 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspect Biology.* 3(4): 1-13.
- Surtiningsih, T dan Mariam, S. 2011. Efektifitas Campuran Pupuk Hayati Dengan Pupuk Kimia Pada Pertumbuhan Dan Produksi Tanaman Selada Bokor (*Lactuca sativa*, L.var.Crisp). *Jurnal Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam.* 14(2): 4-8.
- Walsh, P.S., David, A.M., and Russel, H. 2013. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* 55(3): 134-139.
- Widiarta, A. 2011. Analisis Keberlanjutan Praktik Pertanian Organik Di Kalangan Petani (Kasus: Desa Ketapang, Kecamatan Susukan, Kabupaten Semarang, Propinsi Jawa Tengah). *Skripsi.* Departemen Sains Komunikasi Dan Pengembangan Masyarakat Fakultas Ekologi Manusia Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Widiarta, A., Soeryo, A., dan Widodo. 2011. Analisis Keberlanjutan Praktik Pertanian Organik Di Kalangan Petani. *Jurnal Transdisiplin Sosiologi, Komunikasi, dan Ekologi Manusia* 5(1): 71-89.

Widyawati, A. 2008. *Bacillus* sp. Asal Rhizosfer Kedelai Yang Berpotensi Sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman Dan Biokontrol Fungi Patogen Akar. *Thesis*. Program Studi Biologi Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.