

ANALISA KANDUNGAN IAA PADA PUPUK ORGANIK HAYATI (POH)-STARTMIK LIPI DAN ISOLAT TUNGGAL SEBAGAI STARTER SERTA ISOLAT BARU KANDIDAT UNTUK PENINGKATAN KUALITAS

Tirta Kumala Dewi, Sarjiya Antonius, Hartati Imamudin

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi – LIPI
Cibinong Science Center Jl. Raya Jakarta Bogor, Km 46 Cibinong 16911
Tel. 021-8765066, Fax. 8765062

ABSTRACT

In order to improve the quality of liquid organic biofertilizer (LOB), the effect of storage on the containing of Indol Acetic Acid (IAA) growth factor and the supporting tryptophan as inducer of IAA production were conducted. The results showed that 5 months storage of LOB had higher concentration of IAA than 1 year storage. Regarding single isolate of inoculant, addition of tryptophan in the culture media increased the production of IAA. The new isolate of *Klebsiella pneumonia* was able to produce the highest IAA compare to all isolate of the collected beneficial microorganisms.

PENDAHULUAN

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa yang sangat vital guna mengawali, menginisiasi terjadinya pertumbuhan tanaman, berperan penting dari pertumbuhan perakaran sampai pembentukan buah. Menariknya bahwa ZPT juga bisa dihasilkan oleh mikroba perakaran (Plant Growth Promoting Rhizobacteria/PGPR) yang jauh lebih baik manfaatnya dibanding ZPT yang disintesis melalui reaksi kimia biasa. Untuk itu PGPR penghasil hormon tumbuh berperan vital dalam pembuatan pupuk organik hayati (POH) seri StarTmik, Beyonic-LIPI. Langkah-langkah untuk mengkarakterisasi mikroba yang mempunyai kemampuan menghasilkan hormon tumbuh IAA (*Indole-3-Acetic-Acid*) sebagai pendukung pupuk organik hayati Beyonic-LIPI seri StarTmik diawali dengan mengisolasi

bakteri dari sampel yang telah dikoleksi dari berbagai daerah di Nusantara, metoda yang digunakan adalah dengan menumbuhkan pada media selektif (Antonius et al, 2007). Bakteri yang mampu menghasilkan IAA secara kualitatif akan berwarna merah muda ketika ditumbuhkan pada TSB dengan precursor *L-Tryptophan* dan ditetesi dengan reagen *Salkowski* dan di inkubasi dalam ruang gelap selama 1 jam. *L-Tryptophan* sangat dibutuhkan untuk biosintesis IAA. Analisa secara kuantitatif umumnya dilakukan dengan dua metode yaitu spektrofotometri dan HPLC. Panjang gelombang yang di gunakan pada metode spektrofotometri adalah 530 nm. Pada HPLC, kolom yang digunakan adalah C-18 *reverse phase* dengan detektor UV-Visible pada panjang gelombang 280 nm.

Analisis pestisida dan IAA dapat menggunakan Spektrofotometer namun dalam perkembangannya digunakan HPLC untuk hasil yang lebih akurat. Analisis pestisida dan IAA menggunakan spektrofotometer UV Visible digunakan untuk menentukan konsentrasi pestisida dan IAA berdasarkan warna yang dapat di serap. Absorbansi yang terukur berbanding lurus dengan konsentrasi dalam sampel. Dengan demikian, metode spektrofotometer hanya dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi dalam sampel yang berwarna.

Pada perkembangannya analisis IAA tidak hanya bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dalam sampel, tetapi juga kandungan senyawa lain yang terdapat di dalamnya. Hal ini untuk lebih memastikan senyawa yang di analisis merupakan senyawa yang di inginkan. Dengan demikian metode pemisahan yang efektif dan efisien sangat di butuhkan. Metode pemisahan yang biasa digunakan untuk penentuan suatu senyawa adalah HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau biasa di sebut Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kandungan IAA pada Pupuk Organik Hayati (POH) seri StarTmik-Beyonic LIPI pada kondisi yang berbeda, dari isolat murni starter ketika ditumbuhkan secara terpisah dan juga untuk mengetahui beberapa isolat bakteri dari hasil isolasi dalam rangka *Updating* (pembaruan)

MATERIAL DAN METODE

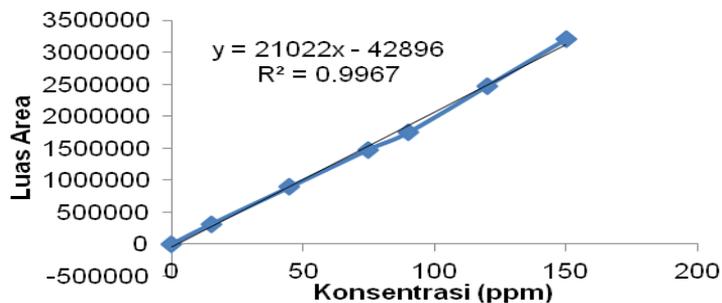
Analisis konsentrasi IAA (Indole-3-Acetic Acid) di dalam pupuk organik cair hayati di lakukan terhadap 5 sampel pupuk yang memiliki umur berbeda. Masing- masing pupuk di ambil 5 mL kemudian di

sentrifuge pada 10000 rpm selama 15 menit. Supernatan di ambil kemudian di atur pH nya menjadi 2,8 menggunakan HCl. Selanjutnya di lakukan ekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan volume 1 : 1 sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi yang di diperoleh kemudian dievaporasi untuk menguapkann etil asetat. Evaporasi di lakukan pada suhu ruang pada 105 rpm. Evaporasi dilakukan sampai larutan menjadi kering kemudian di larutkan kembali dalam etanol absolute.

Hasil evaporasi dianalisi dengan menggunakan HPLC. Fase gerak yang di gunakan adalah metanol : asam asetat : akuabides (30:1:70 v/v/v). Kolom yang di gunakan adalah C-18 *reverse phase* dengan detektor UV pada panjang gelombang 280 nm dan kecepatan alir 1,2 mL/ menit. Standar yang di gunakan adalah larutan IAA murni yang di ukur pada keadaan dan kondisi yang sama. Dengan cara yang sama juga dilakukan untuk analisa IAA dari biakan tunggal murni isolat starter maupun isolat bakteri baru dalam rangka *updating*.

Untuk melakukan kuantifikasi kadungan IAA menggunakan HPLC, berdasar kurva standard IAA berikut:

Konsentrasi	Luas Area
0	0
15	309670
45	894077
75	1479362
90	1746126
120	2471310
150	3205181



HASIL

Beberapa kriteria penting yang terkait kualitas POH adalah berapa lama daya tahan terhadap penyimpanan. Mengingat POH merupakan inovasi antara nutrisi organik atau penyubur tanaman dan agen hayati (dilaporkan terpisah), maka keberadaan zat hormon tumbuh IAA menjadi bagian yang sangat penting.

Pada tabel 1 ditampilkan data hasil analisa kandungan IAA yang sangat menarik mengingat kandungan IAA yang paling tinggi ketika POH disimpan 6 bulan dan disusul dari sampel POH yang disimpan selama 1 tahun. Sedangkan pada POH yang disimpang relatif lebih singkat kandungan IAA-nya termasuk rendah. Data yang demikian mengindikasikan bahwa IAA disekresikan oleh agen hayati POH pada saat-saat ketika kondisi lingkungan tumbuh sudah kurang mendukung agen hayati POH tersebut. Ada kemungkinan IAA dihasilkan/disekresikan pada masa-masa istirahat, seperti layaknya pada produksi metabolit sekunder.

Tabel 1. Kandungan IAA pada produk POH Startmik-LIPI

Pupuk	Konsentrasi IAA (ppm)
Pupuk A (penyimpanan 1 tahun)	18,768
Pupuk B (Pisang, 6 Bln)	55,523
Pupuk C (Penyimpanan 3 Bln)	9,737
Pupuk D (Baru)	3,006
Pupuk E (Baru)	2,893

Analisis IAA pada beberapa isolat tunggal sebagai starter POH-Startmik dan isolat baru untuk peningkatan kualitas

Analisis IAA dapat menggunakan Spektrofotometer namun dalam perkembangannya digunakan HPLC untuk hasil yang lebih akurat. Analisis IAA menggunakan spektrofotometer UV Visible digunakan untuk menentukan konsentrasi IAA berdasarkan warna yang dapat di serap. Absorbansi yang terukur berbanding lurus dengan konsentrasi dalam sampel. Dengan demikian, metode spektrofotometer hanya dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi dalam sampel yang berwarna.

Analisis IAA di lakukan terhadap isolat-isolat yang merupakan pendukung dalam pembuatan POH-Startmik LIPI. Isolat-isolat tersebut di analisis mengguakan dua metode yaitu spektrofotometer dan HPLC. Pada

metode spektrofotometer yang di gunakan di lakukan variasi yaitu isolat dengan penambahan tryptophan dan tanpa penambahan tryptophan.

Tabel Hasil Analisis IAA menggunakan spektrofotometer dan HPLC tanpa Tryptophan

isolat	IAA (TSB & Bakteri)							
	Spektrofotometer				HPLC			
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
P. Florescence A	0,000	0,000	0,000	0,530	0	0	0	2,563
P. Florescence B	0,000	0,000	5,348	5,508	0	0	4,107	6,263
AA 1	0,000	0,273	1,106	1,356	2,091	0	2,414	2,580
AA 2	0,000	0,144	18,970	15,780	2,118	0	4,110	4,304
L7T03	0,000	2,212	4,674	4,212	2,222	2,435	2,462	2,650
P1K0.1	0,000	0,023	43,674	14,568	0	2,214	5,390	5,302
140 B	0,000	0,000	0,364	-0,098	0	2,188	0	2,224
140 B**	0,000	0,447	0,856	0,697	0	2,261	2,542	0
4A	0,000	0,000	0,167	0,530	0	2,184	0	0
4E	0,000	0,000	2,333	0,364	0	2,157	2,149	0
III B	0,000	0,000	3,750	4,379	2,647	0	0	0
PP2	0,000	0,000	2,273	4,455	2,068	0	2,371	2,510
CC 13	0,000	5,015	5,258	1,371	0	0	2,484	2,798
CC 20	0,606	0,386	1,780	1,432	0	2,054	2,250	2,592
CC 88204	0,000	0,697	1,826	2,508	0	2,090	2,428	2,771

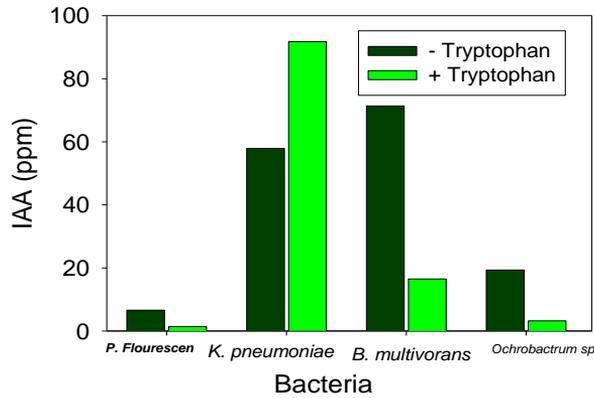
Media TSB yang mengandung isolat agen hayati POH di tambahkan dengan 200 ppm *tryptophan*, kemudian media tersebut di *shaker* dengan variasi waktu 0, 24, 48, dan 72 jam. Satu mL sampel diambil kemudian di sentrifuge pada 12000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya sampel di ambil 0,5 ml dan di campur dengan 1 mL larutan salkowsky lalu di inkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Selanjutnya di kur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

Pada hasil analisis IAA menggunakan metode spektrofotometer dan HPLC menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan. Isolat dengan dan tanpa penambahan tryptophan menunjukkan hasil yang berbeda signifikan pula. Isolat tanpa penambahan tryptophan mampu

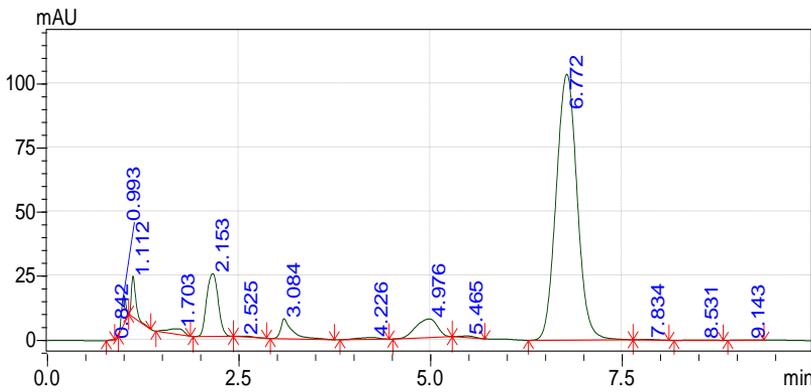
menghasilkan IAA walaupun dalam jumlah yang relatif kecil. Hal ini menunjukkan bahwa isolat tanpa adanya perkusor mampu menghasilkan hormon tumbuh yang dapat di manfaatkan meskipun jumlahnya tidak besar. Jumlah IAA yang di hasilkan berbeda dengan adanya variasi waktu. Waktu retensi sampel di bandingkan dengan waktu retensi standar IAA. Dengan demikian konsentrasi IAA yang di dapat dapat di hitung menggunakan kurva standar dengan menghitung luas area masing-masing sampel.

Tabel Hasil Analisis IAA menggunakan spektrofotometer dan HPLC dengan *tryptophan*

isolat	IAA (TSB & Bakteri + Tryptopan)							
	Spektrofotometer				HPLC			
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
P. Florescence A	0,000	7,682	9,364	7,530	0	2,814	2,725	6,568
P. Florescence B	0,000	4,758	24,083	34,553	2,147	2,783	14,634	6,578
AA 1	0,000	5,091	13,902	12,598	0	2,901	4,935	6,591
AA 2	0,000	1,439	236,788	148,516	0	2,510	19,234	6,573
L7T03	0,000	19,803	27,477	24,674	2,218	3,288	3,917	6,580
P1K0.1	0,000	3,348	216,409	115,424	2,167	2,778	23,967	6,569
140 B	0,000	0,000	1,265	18,182	0	0	3,637	6,571
140 B**	0,000	1,038	0,864	2,136	0	2,174	3,094	6,566
4A	0,000	0,000	7,182	1,492	0	0	2,209	6,539
4E	0,000	0,000	2,068	2,174	2,272	0	2,362	6,555
III B	0,000	0,000	1,030	10,091	0	2,273	2,422	6,553
PP2	0,000	0,000	16,576	12,242	0	2,120	2,177	6,784
CC 13	0,000	12,136	6,977	8,189	0	3,570	5,233	6,551
CC 20	0,000	3,674	15,689	8,364	0	2,525	4,278	6,555
CC 88204	0,000	10,432	1,386	17,750	2,099	3,317	5,135	6,542



Gambar . Kemampuan menghasilkan IAA isolat baru untuk peningkatan kualitas POH



Gambar Tampilah hasil analisa IAA menggunakan HPLC dari sampel *Klebsiella pneumonia* dengan rentesi waktu 6.772.

Pada gambar di atas dapat di lihat bahwa isolat baru *Klebsiella pnemoniae* dan *Burkholderia multivorans* memiliki kemampuan menghasilkan IAA yang lebih tinggi. Hal yang sangat menarik bahwa kedua bakteri tersebut meskipun ditumbuhkan pada media yang tidak mengandung Tryptophan tetapi tetap mampu menghasilkan IAA yang relatif tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O. *et al.* (2007), phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: pp 874880.
- Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z.A. (2004), screening plant growthpromoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, 96: pp 473480.
- Lee, S., FloresEncarnacion, M., ContrerasZentalla, M., GarciaFlores, L., Escamilla, J.E. and Kennedy, C. (2004), Indole3acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.*, 186 (16): pp 53845391.