

**EKSPLORASI BAKTERI PEMFIKSASI NITROGEN NON SIMBIOTIK
PENGHASIL HORMON IAA (*INDOLE ACETIC ACID*) DAN PELARUT
FOSFAT ASAL RHIZOSFER TANAMAN APEL KOTA BATU,
JAWA TIMUR**

SKRIPSI

Oleh
RATNA FADHILAH ISRAWAN
105090107111005



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**EKSPLORASI BAKTERI PEMFIKSASI NITROGEN NON SIMBIOTIK
PENGHASIL HORMON IAA (*INDOLE ACETIC ACID*) DAN PELARUT
FOSFAT ASAL RHIZOSFER TANAMAN APEL KOTA BATU,
JAWA TIMUR**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**Oleh
RATNA FADHILAH ISRAWAN
105090107111005**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**EKSPLORASI BAKTERI PEMFIKSASI NITROGEN NON SIMBIOTIK
PENGHASIL HORMON IAA (*INDOLE ACETIC ACID*) DAN PELARUT
FOSFAT ASAL RHIZOSFER TANAMAN APEL KOTA BATU,
JAWA TIMUR**

RATNA FADHILAH ISRAWAN
105090107111005

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 8 Desember 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Dra.Tri Ardyati, M.Agr, Ph.D
NIP. 19671213 199103 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih S.Si, M.Sc, Ph.D
NIP. 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ratna Fadhilah Israwan
NIM : 105090107111005
Jurusan : Biologi
Penulis Tugas Akhir Berjudul : Eksplorasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Penghasil IAA dan Pelarut Fosfat Asal Rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu, Jawa Timur

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 19 Desember 2014
Yang menyatakan,

Ratna Fadhilah Israwan
105090107111005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizing penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



EKSPLORASI BAKTERI PEMFIKSASI NITROGEN NON SIMBIOTIK PENGHASIL HORMON IAA (*INDOLE ACETIC ACID*) DAN PELARUT FOSFAT ASAL RHIZOSFER TANAMAN APEL KOTA BATU, JAWA TIMUR

Ratna F. Israwan, Tri Ardyati

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang, 2014

ABSTRAK

Kota Batu merupakan sentra produksi Apel terbesar di Jawa Timur sehingga menjadikan Apel sebagai ikon. Produksi Apel Batu menurun diakibatkan berkurangnya bahan organik tanah di perkebunan Apel. Solusi untuk memperbaiki ketersediaan bahan organik tanah adalah penggunaan *biofertilizer*. *Biofertilizer* mengandung mikroba yang mampu menyediakan nutrisi bagi tanaman. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui isolat bakteri asal rhizosfer Tanaman Apel yang memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen, menghasilkan IAA serta melarutkan fosfat. Isolasi dilakukan dengan pengenceran menggunakan sampel tanah rhizosfer tanaman Apel. Kemampuan fiksasi nitrogen menggunakan media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (Nfb) yang diperkaya triptofan dan kit *visocolour alpha ammonium*. Produksi IAA oleh bakteri secara kualitatif dan kuantitatif pada media *Luria Bertani* diperkaya triptofan serta reagen Salkowski. Deteksi pelarutan fosfat dilakukan menggunakan media *Pikovskaya* dan reagen *Mo-Blue*. Empat isolat diisolasi dari rhizosfer tanaman Apel (isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5), semuanya memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen dan menghasilkan IAA. Isolat TR5 tertinggi dalam memfiksasi nitrogen sebesar 1 mg/L. Isolat TR1 tertinggi dalam menghasilkan IAA yakni pada jam ke-48 sebesar 793,55 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan Isolat TR4 melarutkan fosfat tertinggi sebesar 31,28 ppm dengan indeks pelarutan fosfat sebesar 1,21. Ketiga isolat TR1, TR4 dan TR5 berpotensi sebagai agen *biofertilizer*.

Kata kunci : Bakteri, fiksasi nitrogen, pelarut fosfat, produksi IAA, rhizosfer.

EXPLORATION NON-SYMBIOTIC NITROGEN FIXING BACTERIA PRODUCED IAA (*INDOLE ACETIC ACID*) AND PHOSPHATE SOLUBILIZATION FROM APPLE'S TREE RHIZOSPHERE IN BATU, EAST JAVA

Ratna F. Israwan, Tri Ardyati

Biology Department, Faculty of Sciences, Brawijaya University,
Malang, 2014

ABSTRACT

Batu is a center of Apple production city in East Java, therefore apple becomes an icon of this city. The decreasing of Apple production is affected by reducing of organic matter in soil. Solution to restore soil fertility is using biofertilizer. Biofertilizer is biologically active products of microbial inoculums provide nutrients for plants. The objective of this research was to explore bacteria have ability in fixing nitrogen, producing IAA (*indole acetic acid*) and solubilizing phosphate. Isolation of soil sample from apple tree rhizosphere was carried out using serial dilution. Nitrogen fixation ability was assayed qualitatively using nitrogen free bromothymol blue (Nfb) medium enriched with tryptophan. Quantitative measurement of Nitrogen fixation was done by Visocolor ammonium alpha detection kit. IAA production was observed in Luria Bertani medium enriched with tryptophan and Salkowski reagent. Detection of phosphate solubilization was done using Pikovskaya agar and Mo-blue reagent. Four isolates were obtained, isolates TR1, TR2, TR4 and TR5. All isolates have ability to fix nitrogen and to produce IAA. Isolate TR5 has the highest ability of nitrogen fixing (1 mg/L). Isolate TR1 produce maximum IAA concentration (793,55 µg/mL) at 48 hours. Isolate TR4 has the highest ability to solubilize phosphate (31,28 ppm) with index of phosphate solubilization 1,21. Isolate TR1, TR4 and TR5 are potential as biofertilizer agents.

Keywords: Bacteria, IAA production, nitrogen fixation, phosphate solubilization, rhizosphere.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin.

Puji syukur kehadirat Allah SWT. yang telah melimpahkan rahmat, nikmat serta hidayah-Nya sehingga naskah skripsi yang berjudul “Eksplorasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Penghasil Hormon IAA (*Indole Acetic Acid*) dan Pelarut Fosfat Asal Rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu, Jawa Timur” dapat diselesaikan. Naskah skripsi ini disusun atas bantuan dari berbagai pihak, oleh sebab itu diucapkan terizatika kasih kepada:

1. **Ibu Dra. Tri Ardyati, M.Agr.Sc., Ph.D** selaku dosen pembimbing yang telah memberikan segala bimbingan dan nasehat selama penelitian dan penulisan naskah skripsi.
2. **Bapak Dr. Suharjono, M.Si, Luqman Qurata Aini, Sp., MP.PhD** dan **Dr. Ir. Yulia Nuraini, MS** selaku dosen penguji yang memberikan saran dan kritik membangun demi menyempurnakan naskah skripsi ini.
3. **Bapak Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc** selaku Ketua Jurusan Biologi.
4. **Orang tua dan keluarga** atas segala kasih sayang, doa, bimbingan, dan dukungan baik secara material maupun spiritual.
5. **Dra. Nanik Dwi Rahayu** selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi, **Setyawati S.Si** selaku laboran Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik atas kesabaran dan bantuannya selama penelitian.
6. **Teman-teman Biologi angkatan 2010, keluarga besar Laboratorium Mikrobiologi, keluarga besar Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik serta semua pihak lain** yang turut mendukung kelancaran dan penyelesaian skripsi ini.

Penulisan skripsi ini merupakan usaha optimal dalam membantu mengembangkan ilmu pengetahuan. Skripsi ini belum sempurna, oleh karena itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 20 Desember 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kota Batu dan Produksi Apel	4
2.2 Rhizosfer dan <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>	5
2.3 Kemampuan Fiksasi Nitrogen oleh Bakteri	9
2.4 Zat Tumbuh Tanaman (Fitohormon)	12
2.5 Mekanisme Pembentukan IAA oleh bakteri	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat	16
3.2 Deskripsi Area Studi	16
3.3 Pengambilan Sampel	17
3.4 Isolasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non- Simbiotik Penghasil IAA	17
3.5 Karakterisasi Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non-Simbiotik Penghasil IAA	18
3.6 Deteksi Kemampuan Fiksasi Nitrogen oleh Isolat Bakteri	18
3.7 Uji Isolat Penghasil IAA	18
3.7.1 Uji Kualitatif	18

3.7.2 Uji Kuantitatif.....	19
3.8 Uji Pelarut Fosfat oleh Isolat Bakteri	19
3.8.1 Uji Kualitatif	19
3.8.2 Uji Kuantitatif	20
3.9 Rancangan Percobaan dan Analisis Data	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Karakteristik Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Penghasil IAA Hasil isolasi dari Tanah Rhizosfer Tanaman Apel	21
4.2 Karakterisasi Produksi IAA oleh Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Hasil isolasi dari Tanah Rhizosfer Tanaman Apel	25
4.3 Karakterisasi Uji Pelarut Fosfat oleh Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Hasil isolasi dari Tanah Rhizosfer Tanaman Apel	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Data produksi Apel Kota Batu.....	5
2. Berbagai kelompok mikroba pupuk Hayati (<i>Biofertilizer</i>)	9
3. Bentuk sel dan pewarnaan Gram isolat bakteri pemfiksasi Nitrogen dari rhizosfer tanaman apel	22
4. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Pelarut Fosfat oleh Isolat Bakteri	32



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Buah Apel di Kota Batu	4
2.	Akar dan rhizosfer	7
3.	Reaksi mikroba pada siklus N	11
4.	Struktur kimia <i>Indole Acetic Acid</i>	13
5.	Jalur biosintesis IAA <i>tryptophan-dependent</i> pada Tanaman dan Bakteri	15
6.	Area pengambilan sampel di kebun apel organik, Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu....	16
7.	Struktur enzim nitrogenase dan proses fiksasi nitrogen.....	23
8.	Perubahan warna supernatan setelah ditetesi larutan <i>kit</i>	24
9.	Perubahan warna membran nitroselulosa setelah direndam selama \pm 60 menit dalam reagen Salkowski.....	26
10.	Kurva Pertumbuhan Isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5	27
11.	Produksi IAA isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik penghasil IAA jam ke-0, 24,48 dan 72.....	29
12.	Proses biosintesis IAA pada bakteri	30

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Komposisi media NFB (<i>Nitrogen Free Bromothymol Blue</i>)..	46
2.	Komposisi reagen Salkowski	46
3.	Kompisisi media luria bertani <i>broth</i>	46
4.	Komposisi media Pikovskaya Agar	46
5.	Komposisi Perekasi P- reagen <i>Mo-blue</i>	47
6.	Pembuatan Kurva Baku IAA.....	47
7.	Pembuatan Kurva Baku Fosfat	48
8.	Kurva Standar Isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5	48
9.	Analisis statistik	49
LG1.	Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dari Rhizosfer Tanaman Apel di Kota Batu	69
LG2.	Perubahan warna media <i>Nitrogen Free Bromothymol Blue</i> (Nfb) <i>semi solid</i> sebelum	70
LT1.	Jumlah sel isolat bakteri pada media produksi IAA.....	70
LT2.	Konsentrasi IAA yang dihasilkan isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5	71
LT3.	Perhitungan Parameter Lingkungan Perkebunan Apel Organik di Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu	71
LT4.	Karakter Morfologi Koloni Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dari Rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu	72

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Lambang / Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
TR1	isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik, koloni pertama
TR2	isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik, koloni kedua
TR4	isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik, koloni keempat
TR5	isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik, koloni kelima
NFB	<i>Nitrogen free bromothymol blue</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
IAA	<i>Indole Acetic Acid</i>
nm	nano meter
ml	mili liter
mm	mili meter
mg	mili gram
M	Molar
µg / ml	mikrogram per mili liter
mg / L	miligram per liter
µm	mikro meter
%	persen
°c	derajat celcius (satuan suhu)
dkk.	dan kawan-kawan
pH	satuan tingkat keasaman
UV	ultraviolet
IAA	<i>indole acetic acid</i>
Ppm	<i>part per million</i>
NaCl	Sodium klorida
<i>Spread plate</i>	metode cawan sebar
λ	panjang gelombang
<i>phospate index</i>	<i>solubization</i> Indeks pelarut fosfat
MPN	<i>Most probable number</i>
Sel / mL	Satuan jumlah sel per mili liter

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman apel (*Malus sylvestris* Mill) merupakan tanaman buah yang berasal dari daerah sub tropis. Tanaman Apel di Jawa Timur telah diupayakan sejak tahun 1950 dan berkembang pesat pada tahun 1960 sampai dengan saat ini. Kota Batu merupakan salah satu sentra produksi Apel terbesar di Jawa Timur sehingga menjadikan buah Apel sebagai ikon bagi Kota Batu. Produksi Apel di Batu pada tahun 2009 mencapai 1,690,736 kwintal dan menurun menjadi 842,799 kwintal pada tahun 2010 (BPS, 2010). Penurunan produksi tersebut akibat berbagai faktor seperti hama penyakit dan tanah yang tidak lagi subur. Akibat hal tersebut petani Apel di Kota Batu menerapkan sistem pertanian intensif. Sistem pertanian intensif dilakukan dengan menggunakan pupuk kimia dan pestisida kimia secara berkelanjutan (Indahwati, 2010).

Sistem pertanian intensif secara berkelanjutan akan menyebabkan degradasi unsur hara pada tanah sehingga berakibat penurunan produktivitas tanaman Apel dan kualitas buah Apel (Suhariyono dkk., 2010). Unsur hara merupakan salah satu faktor terpenting untuk menunjang pertumbuhan tanaman sehingga perlu dipertahankan keberadaannya. Berbagai cara dilakukan untuk remediasi lahan, salah satunya adalah menggunakan pupuk hayati (*biofertilizer*). *Biofertilizer* merupakan produk biologi yang bersifat aktif karena mengandung inokulan berupa mikroba yang membantu dalam penyediaan nutrisi bagi tanaman (Agarwal, 2005).

Mikroba tanah berperan penting dalam penyediaan unsur hara yang mendukung kesehatan tanaman, struktur tanah dan kesuburan tanah (Prihastuti, 2011). Bertitik tolak dari hal tersebut animo masyarakat pada *biofertilizer* meningkat. Mikroba yang terdapat dalam *biofertilizer* dapat bersimbiosis dengan tanaman atau hidup di rhizosfer tanaman sehingga nutrisi dalam tanah yang awalnya tidak tersedia menjadi tersedia dan dapat digunakan oleh tanaman. Menurut Peraturan Menteri Pertanian nomor 70/Permentan/SR.140/10/2011, terdapat beberapa persyaratan teknis bakteri dapat digunakan sebagai *biofertilizer* diantaranya adalah memiliki kemampuan dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat dan menghasilkan zat

pengatur pertumbuhan tanaman misalnya *indole acetic acid* (IAA). Penelitian membuktikan bahwa mikroba dalam tanah memiliki kemampuan dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat dan memproduksi fitohormon yakni *indole acetic acid* (IAA), *siderofor* maupun antibiotik, sehingga berpotensi untuk dijadikan sebagai *biofertilizer*. Berbagai mikroba yang sudah umum digunakan sebagai *biofertilizer* yaitu *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Cyanobacteria*, *Azolla* dan mikroba pelarut fosfat (Patten dan Glick, 2002 ; TNAU, 2008 ; Mubarikf dkk., 2010). Bakteri pemfiksasi nitrogen akan menyediakan nitrogen yang mampu diserap oleh tanaman dalam bentuk NO_3^- atau NH_4^+ sehingga keberadaan bakteri ini akan memberikan keuntungan bagi tanaman (Giller, 2001; Wedhastrı dkk., 2013).

Bakteri pemfiksasi nitrogen non-simbiotik merupakan jenis bakteri yang mampu melakukan fiksasi nitrogen tanpa melakukan simbiosis dengan tanaman dan dalam penyediaan nutrisi bakteri ini lebih mandiri dibandingkan dengan bakteri simbiotik. Bakteri non simbiotik lebih tahan terhadap stress lingkungan misalnya pH rendah (Biswas dan Mukherjee, 2011). Hal ini menjadi keunggulan dari bakteri non simbiotik. Bakteri non simbiotik yang telah diketahui diantaranya *Azospirillum* dan *Azotobacter* (Kizilkaya, 2009 ; Jolly dkk., 2010). *Azospirillum* dan *Azotobacter* yang berhasil diisolasi dari rhizosfer *Acorus calamus* (tanaman dlingo) diketahui memiliki potensi untuk menghasilkan fitohormon berupa IAA sebesar 3,88 sampai dengan 6,44 $\mu\text{g/ml}$ dengan penambahan triptofan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ sebagai prekursor pembentukan IAA (Prakash dan Karthikeyan, 2013). Selain itu *Azotobacter* dengan potensi yang sama juga berhasil diisolasi dari rhizosfer tebu (*Saccharum officinarum*) (Ashraf dkk., 2011). *Indole acetic acid* akan memacu pembentukan akar adventif dan diharapkan dengan banyaknya akar akan membantu penyerapan nutrisi lebih baik (Taiz dan Zeiger, 2010). Bakteri pelarut fosfat akan menyediakan bentuk fosfat yang mampu dimanfaatkan oleh tanaman sehingga kebutuhan tanaman akan fosfat terpenuhi (Chen dkk., 2006). Penggunaan mikroba sebagai *biofertilizer* dalam sistem pertanian diketahui dapat memperbaiki kuantitas dan kualitas produk pertanian (Board, 2004).

Berdasarkan potensi bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik yang mampu menghasilkan IAA, maka penelitian ini penting untuk

dilakukan. Hal ini dilakukan agar diperoleh isolat bakteri yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan IAA dan memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen sehingga nantinya diharapkan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai *biofertilizer*. Selain itu dilakukan pula kemampuan melarutkan fosfat yang bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri sebagai *biofertilizer*.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dikaji pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik penghasil IAA dari rhizosfer tanaman apel Kota Batu?
2. Berkaitan dengan potensinya sebagai *biofertilizer*, bagaimana kemampuan isolat bakteri tersebut dalam memfiksasi nitrogen, memproduksi IAA dan melarutkan fosfat?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini dilakukan yaitu :

1. Mengetahui isolat bakteri yang memiliki kemampuan dalam memfiksasi nitrogen dan menghasilkan IAA asal rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu.
2. Mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam memfiksasi nitrogen, memproduksi IAA dan melarutkan fosfat.

1.4 Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah isolat bakteri yang diperoleh dapat diperbanyak dan dikembangkan sebagai *biofertilizer* dan dapat diaplikasikan untuk meningkatkan kesuburan tanah dan kesehatan tanaman. Penggunaan *biofertilizer* akan meningkatkan bahan organik tanah.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kota Batu dan Produksi Apel

Apel (*Malus sylvestris* Mill) merupakan buah dataran tinggi (Gambar 1) yang umum dibudidayakan pada saat ini. Beberapa sentra produksi Apel Jawa Timur yang telah berkembang sejak 1950 diantaranya terdapat di Batu, Poncokusumo, Nongkojajar, Malang dan Pasuruan. Apel dapat tumbuh dengan baik di dataran tinggi dengan ketinggian 700 - 1200 mdpl, iklim kering dan curah hujan ideal 1000 – 2600 mm per tahun. Curah hujan yang tinggi dapat menyebabkan bunga gugur dan gagal menjadi buah. Tanaman Apel membutuhkan cahaya matahari yang cukup (50 – 60 %), suhu 16 – 27 °C dengan kelembaban 75 – 85 %. Tanaman Apel dapat tumbuh baik di tanah dengan derajat keasaman tanah 6-7, lapisan organik tinggi, aerasi baik, struktur tanah gembur, tidak mengikat air, adanya pergerakan hara dan kemampuan menyimpan air sehingga dapat dikatakan tanaman apel membutuhkan kandungan air tanah yang cukup (Yulianti dkk., 2005).



(Sumber : Tribun Jatim, 2012)

Gambar 1. Buah apel di Kota Batu

Apel menjadi produk perkebunan khas Kota Batu pada saat ini. Hal ini didukung oleh daerahnya yang tinggi tak kurang dari 600 mdpl dan dikelilingi banyak gunung (Gunung Panderman, Banyak, Welirang) sehingga mendukung untuk dijadikan perkebunan apel. Selain itu tanah di Kota Batu banyak mengandung mineral hasil dari ledakan gunung berapi sehingga mempunyai tingkat kesuburan yang

tinggi. Apel Batu memiliki empat varietas yaitu manalagi, *rome beauty*, *anna* dan *wangling*. Namun dalam beberapa tahun terakhir apel Kota Batu tidak lagi diunggulkan karena terjadi penurunan produksi antara 0,8 – 2,1 %. Apel batu juga bersaing dengan produk apel impor seperti dari Amerika, Australia dan New Zealand (Ditjen Cipta Karya, 2006). Berdasarkan data dari BPS (2010) dan Bapeda Kota Batu (2009) jumlah tanaman apel mencapai 1.974.366 pohon dengan produksi 842.799 kwintal. Jumlah ini mengalami penurunan drastis dari tahun-tahun sebelumnya (Tabel 1). Maka salah satu solusi dari masalah ini adalah dengan *biofertilizer*.

Tabel 1. Data Produksi Apel Kota Batu

Tahun	Jumlah Total Pohon Apel	Produksi (Kwintal)	Produktivitas (kg / pohon)
1999	1.802.717	461,895	19,6
2000	2.874.753	522,433	37,3
2001	3.452.010	450,268	13,4
2002	1.471.760	172,489	10,9
2003	1.539.842	272,933	14,6
2004	1.707.052	674,313	45,9
2005	4.685.468	1,628,316	38,4
2006	4.091.321	2,097,514	42,7
2007	4.035.058	611,000	14,0
2008	4.349.203	1,230,079	28,8
2009	3.608.375	1,690,736	58,6
2010	1.974.366	842,799	17,0

(Bapeda Kota Batu, 2009 ; BPS, 2010)

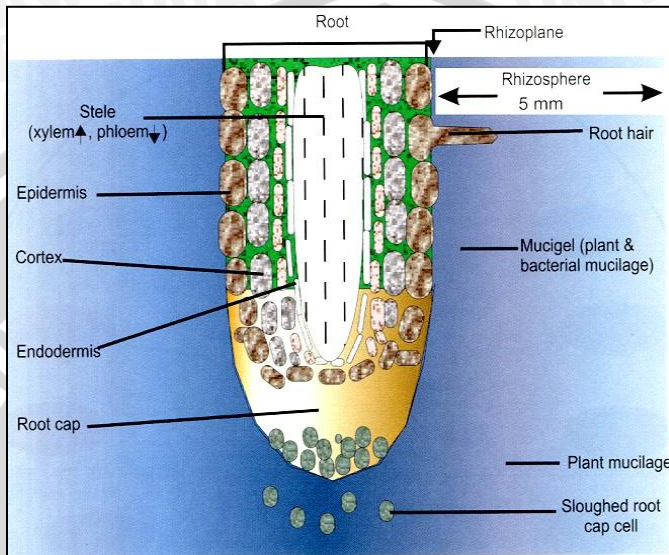
2.2 Rhizosfer dan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)*

Rhizosfer merupakan area di sekitar akar tanaman pada tanah yang mengandung berbagai macam dan berbagai aktivitas dari mikroba (Gambar 2). Aktivitas mikroba pada rhizosfer lebih tinggi dibandingkan dengan tanah yang tidak berada dalam area akar. Keberadaan mikroba ini disebabkan karena terdapat materi organik dan anorganik yang dihasilkan oleh akar. Area sekitar akar yang

disebut rhizosfer jaraknya 1- 2 mm dan paling jauh 20 mm dari akar. Keberadaan mikroba pada rhizosfer bergantung dari jenis tanaman dan jenis tanah. Bagian terluar dari akar yang berhubungan langsung dengan rhizosfer adalah *mucigel*. *Mucigel* dikenal sebagai tudung akar tanaman dan memiliki struktur hampir seperti pektin. Mucigel bersimbiosis dengan lingkungan untuk bakteri pemfiksasi nitrogen dan fungi (Raven dkk., 2005). Rhizosfer merupakan tanah yang sifat biologi dan kimianya dipengaruhi oleh akar. Tanah ini dipengaruhi oleh eksudat akar dan mikroba yang terdapat di bagian tanah ini. Eksudat akar berupa air yang di dalamnya terlarut asam amino, glukosa, karbohidrat, vitamin, protein dan asam organik yang menjadi sumber nutrisi bagi mikroba. Asam amino diketahui sebagai sumber nitrogen penting bagi mikroba (Lugtenberg dan Kamilova, 2009). Hal inilah yang menyebabkan rhizosfer memiliki aktivitas yang dinamis dan jumlah mikroba yang tinggi. Eksudat akar berperan sebagai *messenger* interaksi antara akar dengan mikroba (Kelly, 2005).

Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi keberadaan mikrobia di rhizosfer yakni tipe tanah, kelembaban, pupuk yang digunakan, pH tanah, jarak antara tanah dan akar, spesies tanaman, umur tanaman serta eksudat akar. Eksudat akar mengandung senyawa kimia yang dapat dimanfaatkan mikroba sebagai sumber nutrisi (Khan dkk., 2009). Berdasarkan data oleh Rao (2001) menunjukkan bahwa terdapat mikrobia yang banyak ditemukan terdapat pada rhizosfer yakni bakteri (10^7), aktinomiketes (10^6) dan fungi (10^4). Bakteri menjadi predominasi di rhizosfer dan mengambil substansi nutrisi (asam amino, vitamin dan nutrisi lain) yang diekskresi oleh jaringan tanaman selama pertumbuhan. Mikrobia menghasilkan senyawa metabolik yang dilepaskan ke tanah dan dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Interaksi antara tumbuhan dan mikroba memberikan efek yang menguntungkan bagi kedua organisme tersebut. Bakteri yang diisolasi dari rhizosfer dikenal sebagai *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). Bakteri ini akan membantu fiksasi nitrogen di atmosfer, kelarutan mineral seperti fosfor dan sintesis fitohormon yang dikenal dengan nama kimia IAA (*Indole -3-acetic acid*) (Sachdev dkk., 2009). Kemampuan bakteri untuk menyediakan unsur hara sangatlah penting dalam tanah, karena N, P dan K merupakan unsur yang sangat penting keberadaannya bagi tumbuhan dan tidak dapat secara langsung

tersedia kecuali akibat pemecahan senyawa organik oleh bakteri dalam tanah.



(Sumber : Pepper dkk., 2011)

Gambar 2. Akar dan rhizosfer

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) adalah bakteri yang mengkoloni perakaran tanaman. Bakteri tersebut bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman. Bakteri akan hidup dan berkembang dengan memanfaatkan eksudat yang dikeluarkan oleh perakaran tanaman. Namun tanpa tanaman bakteri akan mampu memanfaatkan bahan organik yang berada dalam tanah untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. *Plant growth promoting rhizobacteria* memiliki peran yakni menghasilkan fitohormon seperti *Indole acetic acid* (IAA), sitokinin, giberelin dan senyawa penghambat produksi etilen kemudian membuat unsur hara dalam tanah mudah diserap oleh tanaman seperti pelarut fosfat dan pengambilan unsur besi oleh tanaman dan mengendalikan hama dan penyakit dengan menghasilkan antibiotik. Produksi fitohormon oleh PGPR membuat tanaman memiliki permukaan akar halus yang lebih luas serta meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam tanah. Permukaan akar yang lebih luas akan berpengaruh besar pada semakin baiknya penyerapan

unsur hara dan air. Hal ini tentu berbanding lurus dengan kesehatan tanaman yang menyebabkan tanaman lebih tahan terhadap stress lingkungan (Soenandar dkk., 2010). Kebutuhan tanaman akan zat organik yang tinggi memungkinkan kehadiran bakteri pada media tanah disebabkan dengan tingginya bahan organik suatu media tanam maka akan tinggi pula sumber karbon pada media tersebut. Karbon merupakan senyawa penting bagi mahluk hidup selain nitrogen, hidrogen dan oksigen tidak terkecuali bagi mikrobia (Stevenson dan Cole, 1999).

Bakteri yang berhasil diisolasi dari rhizosfer terdiri dari berbagai macam genus diantaranya yang berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman Dlingo (*Acorus calamus*) adalah *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., dan *Azotobacter* spp. *Pseudomonas* sp. berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman kacang kedelai. Selain itu *Bryadirhizobium* dan *Rhizobium* dikelompokkan kedalam PGRP. Bakteri tersebut diketahui memiliki kemampuan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman baik secara langsung (produksi IAA, ammonia dan pelarut fosfat) serta secara tidak langsung (produksi HCN, produksi *siderophore* dan antibiotik). Penelitian mengemukakan bahwa *Azospirillum* spp. mampu menghasilkan IAA 3,88 – 6,66 µg/ml dan *Azotobacter* spp. menghasilkan IAA 4,00 – 6,00 µg/ml dengan penambahan triptofan konsentrasi 100 % (Wahyudi dkk., 2011 ; Prakash dan Karthikeyan, 2013). Ketersediaan sumber energi (C-organik) di lingkungan rhizosfer merupakan faktor utama yang menentukan banyaknya nitrogen yang dihasilkan. Penambahan sisa tanaman (biomassa) sebagai sumber C dalam tanah memacu perkembangan populasi bakteri penambat N. Selain itu kemampuan bakteri penambat N bersaing dengan mikroba lain yang hidup dan memanfaatkan sumber energi yang sama .Bakteri ini telah banyak dikembangkan dalam agroindustri sebagai pupuk hayati (*biofertilizer*) (Simanungkalit dkk., 2009).

Selain bakteri pemfiksasi nitrogen dan penghasil fitohormon, bakteri pelarut fosfat juga memiliki peran penting dalam penyediaan unsur hara dalam tanah. Fosfat merupakan unsur hara makro yang dibutuhkan tanaman untuk tumbuh dan berkembang. Namun ternyata fosfat kurang tersedia di tanah dalam bentuk bebas dan dapat dimanfaatkan secara langsung oleh tanaman. Bakteri pelarut fosfat merupakan bakteri yang berperan dalam hal tersebut sehingga

kebutuhan tanaman akan fosfat pada tanaman dapat terpenuhi. Tanaman menyerap fosfat dari tanah dalam bentuk ion fosfat seperti H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} yang terdapat dalam larutan tanah (Elfiati, 2005). Beberapa bakteri yang diketahui mampu melarutkan fosfat dalam konsentrasi tinggi adalah *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., dan *Azotobacter* sp. (Tripti dkk., 2012). Menurut Gunalan (1996) *Biofertilizer* dapat digolongkan berdasarkan fungsinya yakni sebagai penyedia dan peningkat ketersediaan hara, biokontrol, pengurai bahan organik, pemantap agregat tanah dan perombak persenyawaan agrokimia. Macam-macam jenis mikroba dimanfaatkan sebagai agen hayati *biofertilizer* (Tabel 2).

Tabel 2. Berbagai kelompok mikroba pupuk hayati (*biofertilizer*)

Kelompok pupuk hayati	Mikroba	Sistem
Penambat nitrogen simbiotik	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> <i>Anabaena azollae</i>	Simbiosis dengan <i>legume</i>
	<i>Frankia</i> sp.	Simbiosis dengan <i>Azolla</i> Simbiosis dengan <i>non legume</i>
Penambat nitrogen non simbiotik	<i>Azotobacter</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Klebsiella</i> , alga hijau biru	Hidup bebas / asosiatif

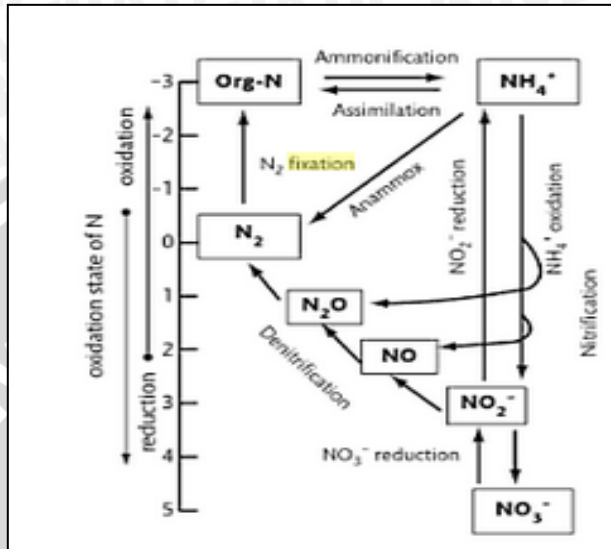
(Sumber : Simanungkalit, 2001)

2.3 Kemampuan Fiksasi Nitrogen oleh Bakteri

Nitrogen menyusun 79 % dari seluruh kandungan gas di atmosfer. Nitrogen tersedia di tanah dalam bentuk sedimen organik. Nitrogen yang tersedia dalam tanah tidak dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman untuk pertumbuhannya. Nitrogen yang tersedia dalam bentuk yang teroksidasi (NO_3) atau bentuk yang tereduksi (NH_4) (ion) yang tersedia (Gardner dkk., 1991). Bakteri memegang peranan

penting dalam kontribusi tersedianya nitrogen bebas di udara dan ammonia merupakan sumber nitrogen yang mampu diserap oleh tanaman sebagai sumber N. Bakteri mampu mempengaruhi kesuburan tanah melalui partisipasinya dalam siklus nitrogen yakni fiksasi nitrogen diikuti dengan amnifikasi, proses nitrifikasi dan denitrifikasi. Fiksasi nitrogen merupakan proses transformasi dari nitrogen bebas di atmosfer menjadi ammonia (NH_3) sebagai nitrogen organik. Amnifikasi merupakan konversi senyawa nitrogen organik menjadi ammonium (NH_4) (Sylvia dkk., 1999). Bakteri yang berperan dalam nitrifikasi akan mengoksidasi ammonia (NH_3) menjadi nitrit (NO_2^-) atau nitrat (NO_3^-). Jumlah nitrat dalam tanah akan menentukan kesuburan tanah. Denitrifikasi akan mereduksi nitrat dan nitrit menjadi ammonia bebas (NH_3) dan terkadang gas nitrogen yang bebas. Bakteri pemfiksasi nitrogen ada yang bersifat bebas (non simbiotik) dan simbiotik dengan tanaman melalui pembentukan nodul. Nitrogen yang difiksasi oleh bakteri akan dipadukan dengan elemen kimia lain sehingga terbentuk senyawa organik dalam tanah. Bakteri simbiotik akan membentuk nodul pada akar tanaman. Salah satu contoh dari bakteri kelompok ini adalah *Rhizobium*. Bakteri akan mendapatkan sumber nutrisi dari tanaman dan memfiksasi nitrogen dari udara. Kelompok bakteri non simbiotik yang berperan dalam fiksasi nitrogen adalah *Azotobacter* (Gillen, 2007). Bakteri non simbiotik akan memanfaatkan nutrisi yang ada di lingkungannya sebagai energi untuk melakukan konversi nitrogen menjadi ammonia (Vadakkattu dan Paterson, 2006). Kemampuan bakteri dalam memfiksasi nitrogen tidak menjadi satu-satunya bukti bahwa bakteri tersebut mampu menstimulasi pertumbuhan tanaman namun hal tersebut juga dilihat dari kemampuannya untuk menghasilkan fitohormon (Maheshwari, 2011).

Fiksasi nitrogen pada mikroba melibatkan enzim nitrogenase. Nitrogenase tersusun dari dua protein kompleks yakni nitrogenase dan dinitrogenase reduktase. Nitrogenase berisi Fe (besi) dan molybdenum (Mo) atau Vanadium (V). Dinitrogenase reduktase berisi Fe. Dua molekul ammonia dihasilkan dari satu molekul gas nitrogen dengan menggunakan 16 molekul ATP dan pasokan elektron dan proton (ion hidrogen) (Simanungkalit dkk., 2009).



(sumber : Kirchman, 2012)

Gambar 3. Peran mikroba pada siklus N

Azotobacter merupakan bakteri non simbiotik yang dapat ditemukan pada rhizosfer berbagai tanaman dan mampu memfiksasi nitrogen serta memproduksi hormon seperti zat pengatur tumbuh. Beberapa zat pengatur tumbuh yang diproduksi adalah *indole acetic acid*, giberelin, vitamin B dan substansi antifungi. Bakteri ini mampu mensekresi ammonia di rhizosfer dengan hadirnya eksudat akar dan membantu modifikasi dalam pengambilan nutrisi oleh tanaman. Bakteri ini memiliki karakteristik heterotrof, aerobik, bakteri nonsimbiotik. Bentuk dari bakteri ini adalah batang - *coccoid*, gram negatif, polimorfik, ukurannya antara 2-10 x 1-2,5 μm . Sel yang muda memiliki flagela peritrikus dan digunakan sebagai alat gerak. Bakteri yang telah mencapai umur tua akan menghasilkan kapsul yang resistan terhadap panas. Terdapat poly β -hydroxy butyrate dan memproduksi polisakarida serta melanin. Keasaman ideal untuk tumbuh antara 6,8 – 7,8 dan temperatur antara 35 – 40 $^{\circ}\text{C}$. Bakteri ini menghasilkan *cyst*, tidak membentuk endospora, katalase positif dan membutuhkan nitrat, garam ammonium dan glukosa dalam

pertumbuhannya. *Azotobacter* pada media *N-free agar* menghasilkan koloni *translucent dew-drop, soft*, putih susu dan mukoid. Genus ini sering digunakan untuk meningkatkan hasil panen (Board, 2004 ; Bergey dkk., 1993).

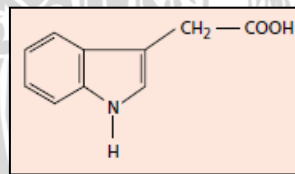
Azospirillum merupakan bakteri non simbiotik, motil, mampu memfiksasi nitrogen serta mensekresi substansi pengatur tumbuh. Bakteri ini diisolasi dari berbagai rhizosfer rumput-rumputan dan *cereal*. *Azospirillum* diketahui memberikan keuntungan kepada pertumbuhan tanaman. *Azospirillum* juga diketahui mampu memproduksi fitohormon yakni auksin (IAA). Bentuknya *vibroid* atau batang dengan ukuran 0,9 -1,2 μm (lebar), gram negatif, memiliki *single polar flagellum* (motil), tumbuh dalam kondisi mikroaerobik, oksidasi positif, membutuhkan ammonium untuk memfiksasi nitrogen, suhu optimum untuk tumbuh 34 – 37 °C dan pH 7. Penggunaan *Azotobacter* dan *Azospirillum* dalam kombinasi ternyata berpengaruh besar pada hasil panen. Sebagai contoh kombinasi dari *Azospirillum brasilense* dan *Azotobacter chroococcum* akan meningkatkan biomassa dari akar dan pemanjangan akar (Bergey dkk., 1993 ; Tuteja dan Gill, 2012)

2.4 Zat Tumbuh Tanaman (Fitohormon)

Fitohormon merupakan sekumpulan zat yang diketahui mempengaruhi pertumbuhan tanaman atau biasa disebut dengan zat penumbuh atau hormon pertumbuhan. Fitohormon memiliki karakteristik yakni molekul organik yang diproduksi oleh tumbuhan, senyawa yang memberikan efek pada pertumbuhan dan perkembangan pada konsentrasi yang rendah, senyawa yang memberikan efek pada salah satu bagian tumbuhan namun berbeda dari jaringan dimana hormon diproduksi serta senyawa yang aksinya tergantung dari struktur kimianya. Terdapat 6 golongan yang termasuk dalam fitohormon yaitu auksin atau *Indoleacetic acid* (IAA), giberelin, sitokinin, asam absisat (ABA), etilen dan brasinosteroid (Lambers dkk., 1998). Masing-masing dari hormon tersebut memiliki efek yang berbeda pada tanaman. Salah satunya efek dari hormon IAA yakni mempengaruhi maturasi ovarium buah, pemanjangan batang dan menginduksi terbentuknya akar. IAA banyak digunakan pada agroindustri untuk pembentukan buah tanpa

biji (Graham dkk., 2006). IAA memberikan peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Auksin merupakan hormon pertumbuhan oleh tanaman yang merangsang pertumbuhan sel. Berbagai substansi alami menunjukkan aktivitas dari auksin namun yang pertama kali diidentifikasi adalah IAA (*Indole-3-acetic-acid*) (Perwitasari, 2008). *Indole Acetic Acid* (IAA) merupakan fitohormon yang diproduksi di daun muda, batang dan biji dari reaksi transaminasi dan dekarbolaksi triptofan. Efek dari IAA pada tanaman sifatnya signifikan dan beberapa berpengaruh secara dominan terhadap apikal, fototropisme, gravitropisme, mencegah absisi buah dan daun serta induksi pertumbuhan akar. Oleh karena itu IAA sangat mempengaruhi hasil panen pada tanaman (Sachdev dkk., 2009). Menurut Ningsih (2003) beberapa fitohormon atau turunannya dapat dihasilkan oleh mikroba tanah. Sebanyak 50 jenis rhizobia yang diisolasi dari rhizosfer pada bermacam tanaman menghasilkan 86 % auksin, 58 % giberelin dan bahan sejenis kinetin. Perubahan pada perkembangan dan pertumbuhan tanaman dalam merespon inokulasi kemungkinan disebabkan oleh zat pengatur tumbuh asal mikroba. Senyawa aktif dihasilkan secara biologis oleh mikrobia dan hal tersebut mempengaruhi ekologi dari kehidupan organisme. Namun keaktifannya didasarkan pada faktor seperti konsentrasi aktif, spesies tanaman, stabilitas dan interaksi dengan mikroba. Mikrobia yang menghasilkan senyawa aktif diketahui memiliki potensi untuk mendorong atau menghambat pertumbuhan tanaman tergantung konsentrasi senyawa aktif yang dihasilkan.



(Sumber : Taiz & Zeiger, 2010)

Gambar 4. Struktur kimia *Indole Acetic Acid*

Struktur molekul dari auksin adalah memiliki cincin indol, memiliki rantai samping yang memiliki gugus karboksil (COOH), terdapat 1 atau 2 atom C diantara cincin dan gugus karboksil. Indol memiliki muatan positif dan gugus karboksil memiliki muatan

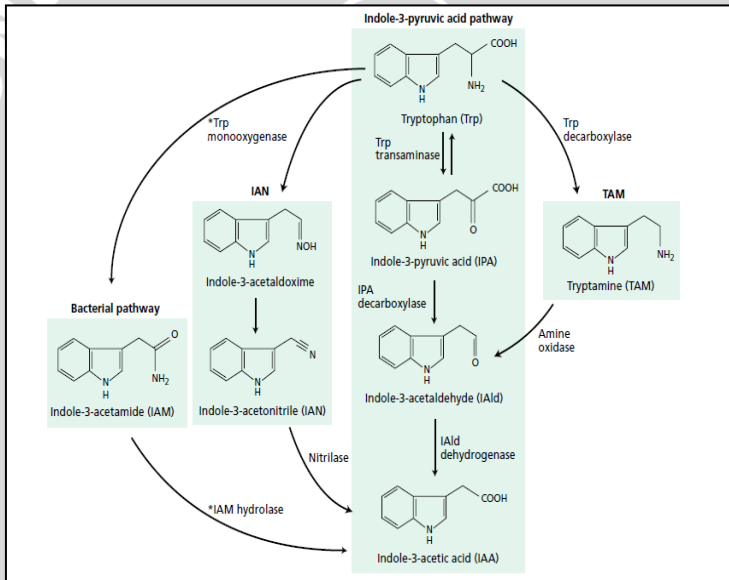
negative (Saupe, 2007). IAA selain diproduksi oleh tanaman juga ternyata terdapat sumber IAA yang bersifat eksogen yakni dari mikroba seperti bakteri dan mikoriza. Beberapa bakteri rhizosfer yang diketahui memiliki kemampuan menghasilkan IAA antara lain *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Axospirillum* dan *Kluyvera ascorbata* (Astuti, 2008).

2.5 Mekanisme Pembentukan IAA oleh Bakteri

Setiap jenis bakteri penghasil IAA memiliki jalur sintesis IAA yang berbeda satu sama lain. Triptofan diidentifikasi sebagai prekursor utama untuk biosintesis IAA pada bakteri. Berdasarkan penelitian Jaeger dkk. (1999) triptofan dideteksi ditemukan di rhizosfer terutama disekitar akar 12-16 cm dari ujung akar. Triptofan yang ada di area rhizosfer ini menjadi prekursor utama bagi mikroba untuk menghasilkan IAA. Jumlah bakteri yang tinggi juga ditemukan disekitar akar yang banyak mengandung eksudat sukrosa dan triptofan. Triptofan terdapat di dalam tanah dengan konsentrasi rendah yang dimanfaatkan oleh mikroba untuk membentuk auksin dan dapat ditingkatkan dengan penambahan triptofan eksogenus dalam tanah sehingga dapat meningkatkan biosintesis auksin oleh mikroba (Arkhipchenko dkk., 2006).

Pupuk organik menjadi salah satu sumber dari triptofan eksogen dalam tanah. Selain itu ternyata sumber asam amino triptofan mampu didapatkan dari kotoran ayam meskipun belum berupa L-tryptophan bebas dan konsentrasinya rendah (Andanawarih, 2008). Jalur sintesis IAA menggunakan prekursor triptofan meliputi jalur IPA (indole-3-pyruvic acid), jalur TAM (tryptamine), jalur IAN (indole-3-acetonitrile), jalur IAM (indole-3-acetamide) dan diketahui pula bahwa IAA juga dibentuk dari indol atau Indole-3-glycerol Phosphate (Gambar 5). Jalur IPA merupakan jalur yang umum digunakan dengan adanya triptofan sebagai prekursor. Terdapat reaksi deaminasi untuk membentuk IPA dan dilanjutkan dengan reaksi dekarboksilasi untuk membentuk IAId (indole-3-acetaldehyde). Indole-3-acetaldehyde kemudian dioksidasi menjadi IAA dengan dehidrogenasi yang spesifik. Jalur TAM hampir sama dengan jalur IPA kecuali adanya reaksi terbalik dari deaminasi dan dekarboksilasi serta enzim berbeda yang terlibat. Jalur IAN yakni triptofan dikonversi menjadi indole-3-acetaldoxime kemudian menjadi indole-3-acetonitrile.

Enzim yang mengkonversi IAN menjadi IAA adalah nitrilase. Kemudian jalur IAM disebut sebagai *intermediate* yang digunakan oleh bakteri untuk membentuk IAA. Jalur IAM menggunakan 2 enzim yakni triptofan monooksigenase dan IAM hidrolase. Adanya auksin yang dihasilkan oleh bakteri mengakibatkan perubahan morfologi pada tumbuhan inangnya. Konversi triptofan menjadi IAA dilakukan oleh gen tertentu yang mengkode enzim pembentuk IAA. Selain triptofan sebagai prekursor ternyata faktor lingkungan turut mempengaruhi ekspresi dari gen tersebut yakni seperti pH lingkungan, sumber karbon, letak gen dalam kromosom atau plasmid dan fungsinya sebagai tahap patogenesis pada bakteri terhadap tanaman (Spaepen dkk., 2007).



(Sumber : Bartel, 1997)

Gambar 5. Jalur biosintesis IAA *tryptophan-dependent* pada tanaman dan bakteri

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian tentang eksplorasi bakteri pemfiksasi nitrogen non-simbiotik sebagai penghasil hormon IAA (*Indole Acetic Acid*) dan pelarut fosfat asal rhizosfer tanaman apel Kota Batu, Jawa Timur dilakukan pada bulan Februari sampai dengan Oktober 2014. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Deskripsi Area Studi

Sampel tanah diambil dari perkebunan Apel organik di Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu. Lokasi terletak di Kaki Gunung Arjuno dengan luas $\pm 3112 \text{ m}^2$, ketinggian 1592 mdpl dan suhu udara $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Jenis apel yang ditanam di lahan organik adalah apel jenis Anna. Area pengambilan sampel dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Area pengambilan sampel di kebun Apel organik, Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu (Area ditandai kotak berwarna kuning)

3.3 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari perkebunan Apel organik di Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu. Tanah digali hingga terlihat akar utama, serabut tanaman apel dan tanah disekitar akar tanaman Apel dilakukan *sampling* dengan menggunakan cetok. Sampel diambil sebanyak 5 ulangan dan setiap ulangan merupakan komposit dari 5 titik. Sampel tanah kemudian dimasukkan dalam plastik dan disimpan dalam kotak isotermis berisi es kering untuk dibawa ke laboratorium. Area tanah yang dipilih sebagai tempat pengambilan sampel dilakukan pengukuran suhu serta di kebun apel dilakukan pula pengukuran intensitas cahaya, ketinggian lokasi, diameter batang pohon Apel, tinggi pohon Apel dan luas kanopi. Faktor abiotik yakni pH tanah, bahan organik tanah dan kelembaban tanah dilakukan penghitungan di laboratorium.

3.4 Isolasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non-Simbiotik Penghasil IAA

Metode penetapan bakteri penambat nitrogen non simbiotik dilakukan mengacu pada metode Nabti dkk., (2007) yang dimodifikasi. Sampel rhizosfer ditimbang sebanyak 25 gram dimasukkan ke dalam 225 ml NaCl 0,85 %. Suspensi dihomogenasi dengan menggunakan *vorteks*. Suspensi larutan diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl 0,85 % untuk memperoleh seri pengenceran 10^{-2} . Suspensi larutan diencerkan hingga mencapai seri pengenceran 10^{-6} di dalam tabung reaksi berisi 9 ml NaCl 0,85 % dan dilakukan penggantian pipet volume setiap pengencerannya. Suspensi larutan dari masing-masing pengenceran diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan dalam 5 ml media NFB *semi solid* (metode MPN). Setelah itu dilakukan inkubasi selama 5 - 6 hari pada suhu 28 °C. Tabung reaksi yang terdapat perubahan warna media dari kuning kehijauan menjadi biru diinokulasikan sebanyak 0,1 ml pada media agar NFB yang diperkaya *yeast extract* (0,05 gram/L) dan 0,5 mg/L triptofan kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30 °C. Bakteri yang tumbuh pada media dilakukan karakterisasi morfologi. Bakteri yang telah dikarakterisasi kemudian dilakukan pemurnian dengan metode pengenceran dan *spread plate* hingga mendapatkan koloni tunggal bakteri. Koloni tunggal bakteri ditumbuhkan pada media nutrisi agar miring yang diperkaya triptofan sebagai stok dan

diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam, kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

3.5 Karakterisasi Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Penghasil IAA

Isolat bakteri dikarakterisasi dengan pengamatan karakter morfologi koloni yang dilakukan untuk membedakan antarkoloni. Karakter morfologi yang diamati yakni bentuk koloni, tepian koloni, elevasi, warna koloni dan pewarnaan sel (cat Gram). Karakterisasi terhadap isolat bakteri juga dilakukan secara mikroskopis dengan penghitungan panjang sel bakteri.

3.6 Deteksi Kemampuan Fiksasi Nitrogen oleh Isolat Bakteri

Deteksi kemampuan fiksasi nitrogen dilakukan mengacu pada metode Latt dkk. (2009) yang dimodifikasi. Isolat bakteri yang didapatkan ditumbuhkan pada 25 ml media NFB *broth* tanpa *bromothymol blue* dan diinkubasi pada 125 rpm, 30 °C, selama 7 hari. Kemudian setelah 7 hari kultur dilakukan sentrifugasi pada suhu 10.000 rpm, 28 °C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. 2 tetes NH₄-1 ditambahkan pada sampel dan dicampur. Dilanjutkan dengan 1/5 sendok NH₄-2 ditambahkan dan dicampur, kemudian didiamkan selama 5 menit. Terakhir 1 tetes NH₄-3 ditambahkan dan dicampurkan, kemudian didiamkan selama 5 menit. Perubahan warna pada supernatan dibandingkan dengan *color chart* dari *kit Visocolor*® *Alpha Ammonium* untuk menentukan konsentrasi dari ammonium.

3.7 Uji Isolat Penghasil IAA

3.7.1 Uji Kualitatif

Uji produksi IAA secara kualitatif dilakukan mengacu pada metode Bric dkk. (1991) yang dimodifikasi. Langkahnya yakni setiap isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi dikulturkan pada 10 ml *Luria bertani Broth* yang diperkaya dengan 0,5 mg/L triptofan dan dilakukan diinkubasi pada 120 rpm, 28 °C selama 48 jam. Kultur kemudian dilakukan *spread plate* sebanyak 0,1 ml pada media *Luria bertani agar* yang telah diperkaya 0,5 mg/L triptofan. Setiap cawan yang telah diinokulasi dengan bakteri dilapisi membran nitroselulosa. Cawan kemudian diinkubasi hingga koloni mencapai diameter 0,5-2

mm. Setelah koloni mencapai ukuran tersebut, membran diambil dari media dan direndam dalam reagen Salkowski dan diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 60 – 120 menit. Membran nitroselulosa akan berubah warna menjadi merah atau merah muda apabila bakteri menghasilkan IAA.

3.7.2 Uji Kuantitatif

Uji aktivitas produksi IAA dilakukan mengacu pada metode dari Saharabude (2011) dan Patten dan Glick (2002) yang dimodifikasi. Isolat dikulturkan dalam 10 ml media *Luria bertani broth* (LB) yang telah diperkaya dengan 5 mg/L triptofan dan diinkubasi hingga jumlah sel dalam kultur mencapai 10^7 sel/mL. Pengujian dilakukan dengan menggunakan perlakuan waktu inkubasi. Media LB diperkaya dengan 5 mg/L triptofan. Setiap media LB yang ditambahkan triptofan diinokulasikan 1 % kultur isolat kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C dengan waktu inkubasi 0, 24, 48 dan 72 jam. Setelah diinkubasi, kultur diambil sebanyak 3 ml dan dipindahkan ke dalam tabung propilen steril. Setiap *sampling* pada jam ke-0, 24, 48 dan 72 jam dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan hemositometer. Hasil *sampling* dilakukan disentrifugasi pada 8.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 mililiter dan dicampurkan dengan 2 mililiter reagen Salkowski, dihomogenasi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Terakhir diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 530 nm. Jumlah IAA yang dihasilkan didapatkan dengan mengkonversi absorbansi pada kurva baku IAA.

3.8 Uji Pelarut Fosfat oleh Isolat Bakteri

3.8.1 Uji Kualitatif

Uji pelarut fosfat secara kualitatif dilakukan mengacu pada metode Tripti dkk. (2012) yang dimodifikasi. Langkahnya yakni isolat yang telah diremajakan diinokulasikan pada media *Pikovskaya Agar* secara aseptis. Isolat diinokulasikan dengan metode total dan dilakukan 3 kali ulangan. Cawan berisi media *Pikovskaya Agar* yang telah diinokulasikan bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 – 4 hari. Isolat dikatakan mampu melarutkan fosfat apabila terdapat zona bening disekitar koloni yang tumbuh di media *Pikovskaya Agar*. Zona bening yang dihasilkan dilakukan pengukuran dengan menggunakan

jangka sorong. Lalu dilakukan penghitungan *phospate solubization index* dengan rumus total diameter (zona bening)/ diameter koloni.

3.8.2 Uji Kuantitatif

Uji pelarut fosfat secara kuantitatif dilakukan dengan mengacu pada metode Rfaki dkk. (2014) yang dimodifikasi. Langkahnya yakni isolat yang telah diremajakan diinokulasikan sebanyak 1 oose pada 10 ml media *Pikovskaya Broth* secara aseptis, dihomogenasi dan diinkubasi hingga jumlah sel mencapai 10^7 sel/mL. Kultur isolat tersebut kemudian diambil sebanyak 0,2 ml dan diinokulasikan pada *Pikovskaya Broth* kemudian diinkubasi pada 120 rpm, 30 °C selama kurang lebih 7 hari. Setelah 7 hari, kultur isolat dilakukan filtrasi dengan menggunakan kertas whatman no.42. Kemudian filtrat dilakukan sentrifugasi pada 10.000 rpm, 28 °C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian diambil sebanyak 5 ml dan ditambahkan dengan pereaksi P (reagen *Mo-blue*) sebanyak 2 ml, dihomogenasi dan diinkubasi pada suhu ruang selama \pm 30 menit. Terakhir diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 693 nm. Kultur bakteri dilakukan pula pengukuran pH dengan menggunakan pH meter. Jumlah fosfat terlarut didapatkan dengan mengkonversi absorbansi pada kurva baku fosfat.

3.9 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan tiga kali pengulangan. Analisis statistik dengan menggunakan *one way ANOVA* ($P = 0,05$). Jika uji *one-way ANOVA* tidak terpenuhi dilakukan uji lanjutan *Games-Howell*. Indeks pelarut fosfat dan fosfat terlarut diuji korelasinya. Apabila data normal maka menggunakan uji korelasi *pearson* dan apabila data tidak normal dilakukan uji korelasi *spearman*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Hasil isolasi dari Tanah Rhizosfer Tanaman Apel

Isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik penghasil IAA yang berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman Apel diperoleh sebanyak empat isolat yaitu isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5. Isolat tersebut dipilih berdasarkan kemampuannya tumbuh pada media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (Nfb) *semi solid* dan Nfb *agar*. Masing-masing bakteri yang tumbuh pada Nfb *agar* memiliki karakteristik morfologi yang berbeda (Tabel 3). Berdasarkan hasil pewarnaan Gram diketahui bahwa isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5 memiliki perbedaan Gram dan bentuk sel yang sama (Tabel 3). Menurut Holding (1960) bakteri Gram negatif dapat ditemukan sebanyak 20 % di area rhizosfer. Namun hal tersebut bervariasi bergantung pada bahan organik yang tersedia dalam tanah yang merupakan nutrisi bagi bakteri. Menurut Hong (1994) pertanian organik merupakan usaha tani yang menggunakan pupuk kimia dalam skala minimum dikombinasikan dengan penggunaan bahan alami. Hal tersebut bertujuan untuk memperbaiki dan menyuburkan kondisi lahan serta menjaga keseimbangan ekosistem. Bahan organik memengaruhi kesuburan tanah. Salah satu yang berperan dalam sifat dan tekstur tanah adalah mikroba. Mikroba berperan dalam siklus hara yang akan mendekomposisi bahan organik dalam tanah sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman.

Penghitungan bakteri dengan metode MPN (*Most Probable Number*) menunjukkan bahwa jumlah total bakteri pemfiksasi nitrogen yang berhasil diisolasi dari tanah rhizosfer tanaman Apel dari perkebunan Apel organik adalah sebesar $0,65 \times 10^3$ sel per gram. Rhizosfer memiliki diversitas mikroba yang tinggi. Menurut Sylvia dkk. (1999) rhizosfer berbeda dengan area non rhizosfer. Hal tersebut karena rhizosfer mengandung eksudat akar yang mengandung berbagai nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba tanah untuk tumbuh dan berkembang. Kuantitas dan macam vitamin, senyawa karbon serta asam organik yang terdapat pada eksudat akan memengaruhi populasi mikroba pada rhizosfer. Bakteri penambat nitrogen lebih banyak

dijumpai pada daerah rhizosfer daripada daerah non rhizosfer (Franche dkk., 2009).

Tabel 3. Bentuk sel dan pewarnaan Gram isolat bakteri pemfiksasi nitrogen dari rhizosfer tanaman apel

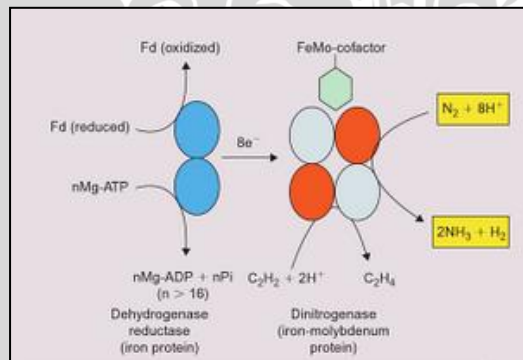
	TR1	TR2	TR4	TR5
Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
Gram	Negatif	Negatif	Positif	Negatif

Bakteri yang tumbuh pada media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (Nfb) *semi solid* merubah warna media dari hijau menjadi biru (Lampiran LG3). Perubahan warna menjadi biru menunjukkan terdapat aktivitas nitrogenase (reduksi N₂ molekul) oleh bakteri pemfiksasi nitrogen. Media Nfb *semi solid* memungkinkan bakteri bergerak atau bersifat motil (Febrianti, 2008 ; Metasari, 2012). Indikator *Bromothymol blue* akan menunjukkan warna biru pada pH yang lebih tinggi (basa) sebagai konsekuensi adanya aktivitas nitrogenase. Bakteri pereduksi N akan mereduksi N di atmosfer menjadi ammonia (Cotton dan Wilkinson, 1989 ; Nurhayati, 2006 ; Khan dkk., 2010). Ammonia merupakan senyawa basa rendah (Bettelheim dkk., 2012). Nitrogen merupakan unsur hara makro dan ditemukan pada semua asam amino yang merupakan penyusun protein organisme (Campbell dkk., 2004). Reduksi dari nitrogen menjadi ammonia dideskripsikan oleh Kirchman (2012) pada persamaan reaksi 1.



Keempat isolat yang berhasil diisolasi dilakukan deteksi ammonium (NH₄) dengan menggunakan *Kit Visicolor Alpha Ammonium*. Hasil uji menunjukkan bahwa masing-masing isolat mampu memfiksasi nitrogen (dideteksi dengan terbentuknya NH₄) yakni dengan berubahnya warna supernatan kultur bakteri menjadi kuning-kehijauan sampai hijau setelah ditetesi dengan larutan *kit*. Kisaran warna yang berbeda menunjukkan perbedaan jumlah ammonium yang terdeteksi (gambar 8). Isolat TR5 mampu

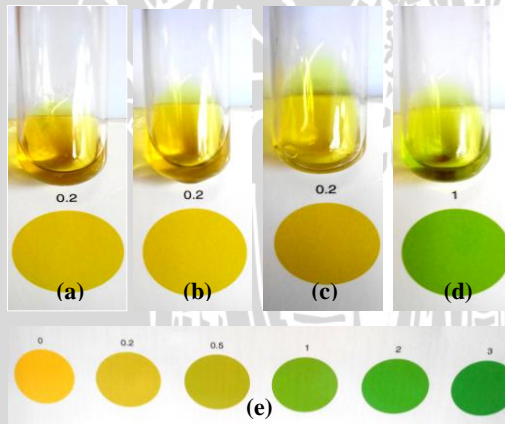
memfiksasi nitrogen dengan kemampuan tertinggi yakni 1 mg/L. Isolat TR1, TR2 dan TR4 mampu memfiksasi nitrogen sebesar 0,2 mg/L. Ammonium yang terdeteksi oleh isolat tersebut dikatakan rendah apabila dibandingkan dengan *Alcaligenes* sp. yang terdeteksi ammonium sebesar 3 mg/L (Latt dkk., 2013) dan isolat selulolitik SL4 dan SL7 masing-masing sebesar 2 mg/L dan 0,5 mg/L (Nugraha dkk., 2014). Nitrogen yang terdapat di udara bebas tidak dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman sehingga diperlukan konversi dalam bentuk NH_4^+ atau NO_3^- . Bakteri pemfiksasi nitrogen simbiotik dan non simbiotik berperan dalam proses tersebut. Bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik mencari sumber energinya sendiri untuk mengkonversi nitrogen menjadi ammonia. Berbeda dengan bakteri pemfiksasi nitrogen simbiotik yang biasanya membentuk nodul (bintil akar) pada akar tanaman dan mendapatkan sumber energi dari tanaman dan nantinya tanaman yang diinfeksi akan mendapatkan sumber nitrogen dari bakteri (Darpan, 1999 ; Vadakattu dan Paterson, 2006). Proses fiksasi nitrogen melibatkan enzim nitrogenase dan gen *Nif*. Fiksasi nitrogen akan menghasilkan NH_3 (ammonia) atau NO_3^- . Konversi tersebut dikenal dengan nitrifikasi. Amonifikasi merupakan proses enzimatik yang mengubah nitrogen organik menjadi ammonium (NH_4^+) dengan bantuan bakteri heterotrof (Sylvia dkk., 1999). Ammonium terbentuk pula akibat kehadiran ion hidrogen dalam tanah (Hidayat, 2009).



(Sumber : Pepper dkk., 2014)

Gambar 7. Struktur enzim nitrogenase dan proses fiksasi nitrogen

Fiksasi nitrogen yang dilakukan oleh bakteri melibatkan enzim yang dikenal dengan nama enzim nitrogenase. Enzim ini dikenal pula dengan nama kompleks nitrogenase karena enzim ini terdiri atas dua komponen protein yaitu protein MoFe (Molybdenum-Iron) dan protein iron (Fe) (Gambar 7). Enzim nitrogenase akan hancur apabila terpapar oleh oksigen. Hal ini menjadi salah satu penghambat aktivitas nitrogenase sehingga berpengaruh pada jumlah nitrogen yang mampu dikonversi oleh bakteri. Bakteri memiliki cara agar enzim nitrogenase tersebut tidak hancur diantaranya adalah meningkatkan kecepatan respirasi agar oksigen yang ada di lingkungan bakteri tetap berada dalam konsentrasi rendah, membentuk polisakarida ekstraselular yang berbentuk lendir sehingga koloni bakteri tidak langsung terpapar oleh oksigen dan pembentukan konformasi oleh protein yang mengikat nitrogenase. Selain itu keberadaan sumber karbon, keberadaan nitrogen kombinasi (seperti ammonium, nitrat dan nitrogen organik), temperatur dan ketersediaan fosfor berpengaruh besar pada ekspresi enzim nitrogenase oleh bakteri. Bakteri akan melakukan fiksasi nitrogen ketika jumlah nitrogen dalam tanah rendah (Sylvia dkk., 1999).



Gambar 8. Perubahan warna supernatan setelah ditetesi larutan kit (a) isolat TR1 (0,2 mg/L) (b) isolat TR2 (0,2 mg/L) (c) isolat TR4 (0,2 mg/L) (d) isolat TR5 (1 mg/L) (e) Spektrum warna Kit Visocolor Alpha Ammonium yang menunjukkan warna dan kadar NH_4^+ yang berbeda (jumlah ammonium ditunjukkan pada angka diatas bulatan berwarna)

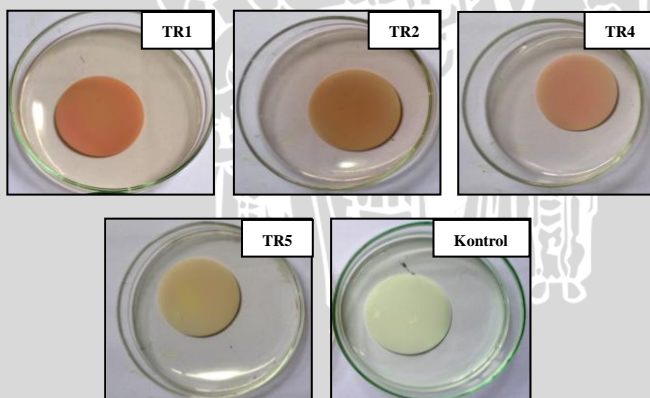
4.2 Karakterisasi Produksi IAA oleh Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Hasil isolasi dari Tanah Rhizosfer Tanaman Apel

Isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik dilakukan uji kualitatif berkaitan dengan potensinya sebagai penghasil IAA. Pengujian dilakukan dengan menggunakan media *luria bertani agar* dengan penambahan triptofan. Kultur cair bakteri dilakukan *spread* di atas media *luria bertani agar* kemudian dilapisi dengan membran nitroselulosa dan dipilih isolat bakteri yang mampu menghasilkan warna merah pada membran. Perubahan warna mengindikasikan adanya indole pada kultur bakteri IAA (Singh dkk., 2014). Hasil uji potensi produksi IAA secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5 menunjukkan perubahan warna menjadi warna merah pada membran nitroselulosa setelah direndam dalam reagen Salkowski. Isolat TR1 memberikan warna merah paling nyata dibandingkan dengan isolat TR2, TR4 dan TR5 (Gambar 9). Semakin pekat warna merah maka semakin tinggi konsentrasi IAA yang diproduksi. Produksi IAA disebabkan oleh adanya prekursor triptofan (*inducer* pembentuk IAA) sebagai sumber triptofan eksogen yang ditambahkan pada media sehingga isolat bakteri mampu untuk menghasilkan IAA. Triptofan merupakan prekursor utama bagi mikroba dan tanaman dalam pembentukan IAA (Maheshwari, 2011). Jumlah IAA akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi triptofan. Pernyataan tersebut didukung oleh Chung dan Tzeng (2004) yang menyatakan bahwa biosintesis IAA sangat bergantung pada triptofan.

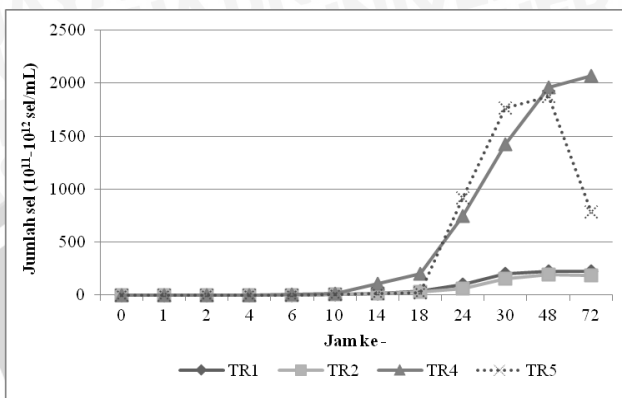
Penggunaan membran nitroselulosa dianggap lebih efektif dibandingkan penambahan reagen Salkowski secara langsung pada media karena reagen Salkowski bersifat asam akan menghidrolisis agar sebagai media pertumbuhan bakteri dan perubahan warna sebagai indikator adanya IAA sulit dilakukan. Oleh karena itu, koloni ditransfer pada membran nitroselulosa sehingga bakteri memiliki tempat yang solid, mengatur orientasi bakteri tersebut (seperti untuk filtrasi metabolit yang dihasilkan bakteri) sehingga pengamatan lebih mudah dilakukan (Bric dkk., 1991).

Menurut Spaepen dan Vanderleyden (2011) 80 % isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari rhizosfer diketahui memiliki kemampuan dalam mensintesis IAA dan prekursor utama untuk sintesis IAA

baik bagi bakteri maupun tanaman adalah triptofan melalui jalur biosintesis IAA *tryptophan-dependent atau independent* (gambar 11). Setiap jenis bakteri penghasil IAA membawa gen pensintesis IAA dan ekspresinya tergantung dari faktor lingkungan dan sifat dari bakteri tersebut. Sebagai contoh pada *Azospirillum brasilense* produksi IAA diregulasi oleh gen *ipdC* (jalur *indole-3 pyruvic acid*) dan menunjukkan bahwa gen tersebut akan mengalami ekspresi yang tinggi ketika berada pada kondisi kekurangan karbon, memasuki fase stasioner dan berada dalam pH asam. Namun pada *Pantoea agglomerans* ekspresi gen *ipdC* tidak dipengaruhi oleh pH lingkungan (Spaepen dkk., 2007). Bakteri yang ada di rhizosfer memanfaatkan nutrisi yang disekresikan oleh jaringan tanaman (eksudat akar) berupa asam amino, vitamin dan nutrisi lain untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Selanjutnya bakteri menghasilkan metabolit yang akan memengaruhi pertumbuhan dari tanaman misalnya zat tumbuh tanaman dan menyediakan nutrisi dalam bentuk yang dapat dimanfaatkan secara langsung oleh tanaman. Sehingga dapat dikatakan keduanya memberikan hubungan timbal balik yang saling menguntungkan (Sachdev dkk., 2009). Hal tersebut didukung oleh Sylvia dkk. (1999) bahwa asam amino triptofan ditemukan dalam tanah dengan konsentrasi rendah dan digunakan sebagai sumber nitrogen bagi mikroba.



Gambar 9. Perubahan warna pada membran nitroselulosa yang mengandung masing-masing isolat setelah direndam selama ± 60 menit dalam reagen Salkowski.



Gambar 10. Kurva Pertumbuhan Isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5

Berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah dibuat (Gambar 10) isolat TR1, TR2 dan TR5 hingga jam ke-48 mengalami fase akhir logaritmik karna jumlah sel yang dihasilkan meningkat kemudian mengalami penurunan jumlah sel (isolat TR2 dan TR5) dan jumlah sel tetap (isolat TR1) pada jam ke-72 yang merupakan tanda dari fase stasioner. Berbeda dengan isolat lainnya isolat TR4 terus mengalami peningkatan jumlah sel seiring dengan bertambahnya waktu yang menunjukkan bahwa hingga jam ke-72 isolat tersebut masih dalam fase logaritmik. Isolat TR5 memiliki laju regenerasi yang paling tinggi yakni 3,03 jam. Kemudian isolat TR1, TR2 dan TR4 berturut-turut 4,2 jam, 4,53 jam dan 5,69 jam. Laju regenerasi dapat diartikan seberapa lama bakteri mampu untuk memperbanyak jumlah / massa / komponen sel sebanyak 2 kali dari jumlah awal sel (Hamdiyati, 2011). Isolat TR4 hingga jam ke-72 masih dalam fase logaritmik akibat laju regenerasinya yang lambat dibandingkan ketiga isolat lainnya.

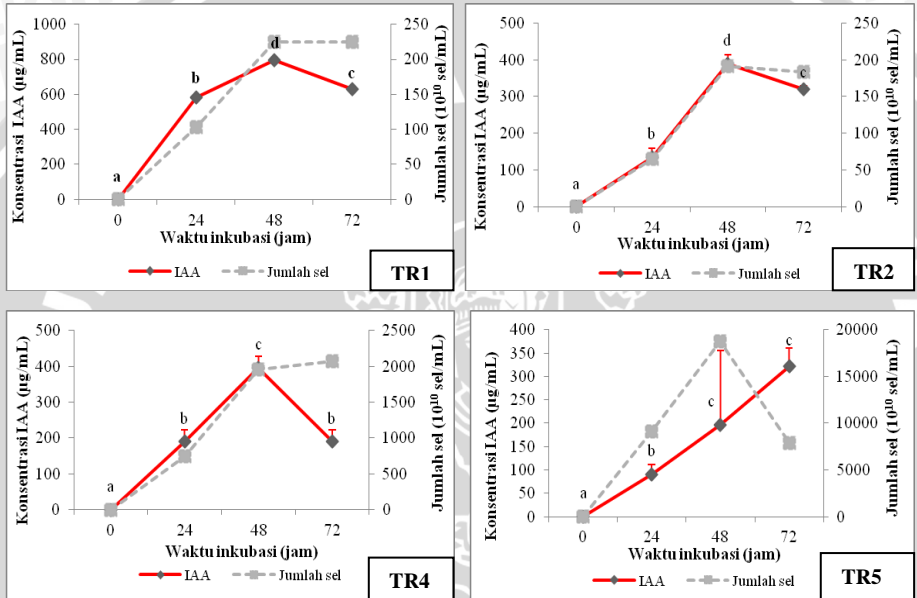
Konsentrasi IAA tertinggi dihasilkan isolat TR1 dan TR2 pada jam ke-48 (fase logaritmik) yakni berturut-turut 793,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 389 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 11). Isolat TR1 dan TR2 mengalami penurunan produksi konsentrasi IAA pada jam ke-72 (fase stasioner). Hasil tersebut didukung oleh penelitian Sahasrabudhe (2011) bahwa bakteri menghasilkan IAA maksimal pada jam ke- 24 atau 48 dan menurun pada jam ke-72. Menurut Gusnainar (2007) dan Andanawarih (2008) produksi IAA tertinggi terjadi pada jam ke-48. Hal tersebut

diakibatkan karena pada jam tersebut bakteri berada pada fase akhir logaritmik sehingga kandungan enzim perubah triptofan menjadi IAA seperti triptofan monooksigenase, IAM hidrolase, indolpiruvat dekarboksilase dan IAAId dehidrogenase dihasilkan dalam jumlah banyak. Konsentrasi IAA berlebih pada lingkungan akan diregulasi oleh bakteri dengan melakukan degradasi atau konjugasi. Penurunan konsentrasi IAA menurut Datta dan Basu (2000) disebabkan karena pembentukan enzim pendegradasi IAA seperti IAA oksidase dan peroksidase.

Namun hasil yang berbeda ditunjukkan pada isolat TR4 dan TR5. Isolat TR4 menghasilkan IAA dalam konsentrasi tertinggi pada jam ke-48 yakni pada fase logaritmik dan konsentrasi IAA turun pada jam ke-72, tetapi pada jam tersebut bakteri masih berada dalam fase logaritmik. Umumnya pada jam ke-72 bakteri berada dalam fase kematian sehingga produksi IAA menurun (Retnowati dkk., 2012). Menurut penelitian Sahasrabudhe (2011) menunjukkan bahwa *Rhizobium leguminosarum* menunjukkan produksi IAA maksimum pada jam ke-48 apabila diberikan sumber karbon berupa laktosa dan manitol. Namun apabila diberikan sumber karbon lain akan menghasilkan IAA maksimum pada jam ke-24. Sehingga diduga hal tersebut berkaitan dengan nutrisi pada media yakni nutrisi tidak cukup untuk ekspresi gen pensintesis IAA. Selain itu laju regenerasi isolat TR4 paling lambat diantara ketiga isolat lainnya.

Isolat TR5 dalam fase stasioner menghasilkan IAA dalam konsentrasi yang cukup tinggi. Regulasi produksi IAA ternyata diduga dipengaruhi oleh *stationary phase sigma factor RpoS* yakni gen yang meregulasi respon bakteri ketika dalam kondisi stress. Promotor gen *ipdC* terdapat sekuen yang mirip dengan sekuen RpoS dan akibat gen ini produksi IAA akan meningkat ketika terjadi stress lingkungan (Zhou dan Gottesman, 1998 ; Patten dan Glick, 2002 ; Spaepen dkk., 2007). Jumlah IAA yang dihasilkan oleh isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5 dapat dikatakan tinggi. Berdasarkan uji statistik produksi IAA oleh isolat TR1 berbeda nyata dibandingkan dengan isolat TR2, TR4 dan TR5 pada jam ke-24 hingga 72. Penelitian Sahasrabudhe (2011) konsentrasi IAA dengan penambah triptofan 5mM pada jam ke-24 yakni 319,31 µg/ml oleh *Rhizobium loti*, 313,63 µg/ml oleh *Rhizobium leguminosarum* dan 198,86 µg/ml oleh *Rhizobium meliloti*. Sedangkan pada penelitian Prakash dan

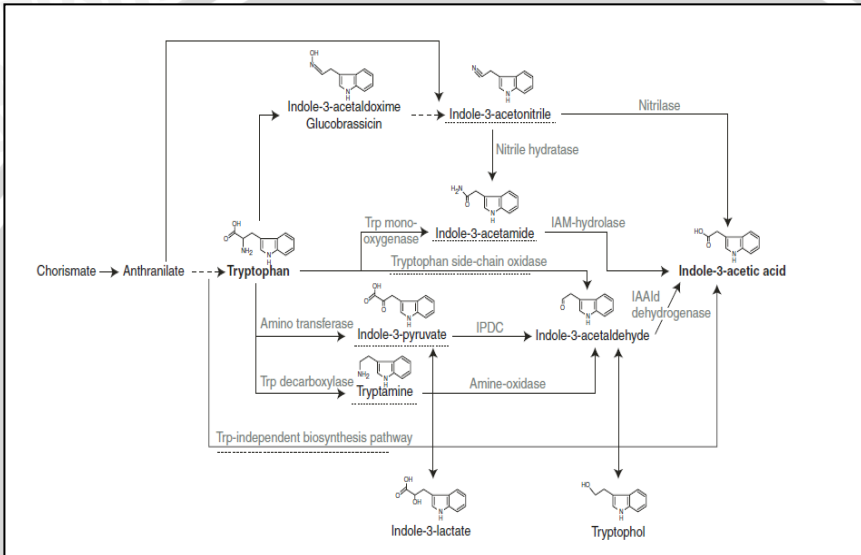
Karthikeyan (2013) konsentrasi IAA dengan penambahan triptofan 100 $\mu\text{g/ml}$ oleh *Pseudomonas fluorescens* sebesar 8 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi triptofan yang bervariasi menghasilkan konsentrasi IAA yang berbeda dan semakin tinggi konsentrasi triptofan maka konsentrasi IAA yang dihasilkan tinggi (Patten dan Glick, 2002).



Gambar 11. Produksi IAA isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik penghasil IAA jam ke-0, 24,48 dan 72. Keterangan: perbedaan notasi menunjukkan beda nyata ($\alpha=0,05$)

Produksi IAA setiap jenis bakteri berbeda dan hal tersebut diakibatkan dari karakteristik fenotip mikroorganisme, pertumbuhan bakteri, aktivitas metabolit, ekspresi gen yang mengkode enzim termasuk biosintesis IAA, signal dari tumbuhan, rendahnya jumlah karbon dan asamnya pH lingkungan (Neeru dkk., 2000 ; Spaepen dkk., 2007 ; Etesami dkk., 2009). Selain itu menurut Spaepen dkk (2007) Konsentrasi IAA turun disebabkan karena adanya *feedback inhibition*. Penghambatan dapat terjadi yang dimodulasi oleh produk akhir IAA dan intermediatnya. Sebagai contoh pada *Pseudomonas*

savastanoi aktivitas enzim pada jalur IAM (gen *IaaM*) dikontrol melalui *feedback inhibition* oleh IAM dan IAA. Kemudian diketahui pula bahwa anthranilat, prekursor dari triptofan mereduksi sintesis IAA. Triptofan akan menghambat pembentukan anthranilat dengan regulasi *negative feedback* pada anthranilat sintase.



(Sumber : Spaepen dkk., 2007)

Gambar 12. Proses biosintesis IAA pada bakteri

Proses biosintesis IAA meliputi beberapa jalur (Gambar 12). Proses biosintesis IAA oleh bakteri meliputi konversi triptofan menjadi IAM oleh triptofan monooksigenase (dikode oleh gen *iaaM*) kemudian IAM dihidrolisis menjadi IAA dan ammonia oleh IAM hidrolase (dikode oleh gen *iaaH*). Jalur tersebut dikenal dengan *Indole-3-acetamide pathway*. Bakteri yang diketahui melalui jalur ini adalah *Rhizobium*, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* (Spaepen dkk., 2007). Adapun jalur lain yakni *indole-3-pyruvate (IPA) pathway*. Jalur ini digunakan oleh *plant beneficial bacteria* seperti *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* bahkan sianobakteria. Langkahnya yakni aminotransferase akan melakukan trasminasi pada triptofan dan

hasilnya adalah IPA. IPA didekarboksilasi menjadi *indole-3-acetaldehyde* (IAAId) yang kemudian dioksidasi menjadi IAA oleh dehydrogenase. Dekarboksilasi dikatalis oleh enzim *indole-3-decarboxylase* (dikode oleh gen *ipdC*) (Spaepen dan Vanderleyden, 2011). IAA dihasilkan bakteri dengan berbagai tujuan diantaranya yakni sebagai bentuk asosiasi antara tumbuhan dan bakteri. IAA yang dihasilkan bakteri diketahui mampu memperluas permukaan akar sehingga absorpsi nutrisi dan air akan meningkat (Maheshwari, 2011).


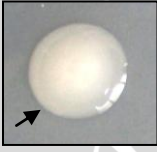


4.3 Karakterisasi Uji Pelarut Fosfat oleh Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiotik Hasil isolasi dari Tanah Rhizosfer Tanaman Apel

Isolat bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik yang diketahui mampu menghasilkan IAA diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Pengujian ini dilakukan sebagai salah satu kriteria pendukung bakteri sebagai *biofertilizer*. Selain memiliki kemampuan menghasilkan fitohormon dan memfiksasi nitrogen, bakteri juga harus memiliki kemampuan melarutkan fosfat serta kemampuan lainnya sesuai dengan baku mutu pupuk hayati (*biofertilizer*) 70/Permentan/SR.140/10/2011. Pengujian ini dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan media *Pikovskaya Agar*. Isolat bakteri berumur 24 jam diinokulasikan pada media *Pikovskaya Agar* dengan metode totol. Kemampuan melarutkan fosfat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang tumbuh di media *Pikovskaya Agar*. Zona bening diukur dengan total diameter zona bening dikurangi dengan diameter koloni bakteri dan dilanjutkan dengan penghitungan indeks pelarut fosfat.

Hasil uji pelarut fosfat menunjukkan bahwa dari empat isolat hanya tiga isolat yakni TR1, TR2 dan TR4 yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri setelah inkubasi selama 72 jam (Tabel 4). Berdasarkan uji statistik diketahui bahwa indeks pelarut fosfat yang dihasilkan isolat TR1, TR2 dan TR4 secara keseluruhan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Dapat diartikan bahwa ketiga isolat bakteri memiliki indeks pelarut fosfat yang sama. Indeks pelarutan fosfat tertinggi dihasilkan oleh TR4 dengan indeks sebesar 2,21. Penggunaan metode totol dianggap kurang efektif karena jumlah sel

yang diambil tidak sama antar bakteri sehingga menghasilkan ukuran koloni yang berbeda.

Tabel 4. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Pelarutan Fosfat oleh Isolat Bakteri. Keterangan : perbedaan notasi menunjukkan beda nyata ($\alpha=0,05$)

Isolat	Kualitatif (Zona Bening)	Kuantitatif	
		Indeks pelarut fosfat	Fosfat terlarut (ppm)
TR1		1,12 ^a	28,44 ^B
TR2		1,09 ^a	23,98 ^A
TR4		1,21 ^a	31,28 ^C
TR5		0	0

Hasil uji pelarut fosfat secara kuantitatif menunjukkan bahwa kemampuan pelarutan fosfat tertinggi dimiliki oleh isolat TR4 yakni sebanyak 31,28 ppm diikuti oleh isolat TR1 yakni 28,44 ppm dan terakhir oleh TR2 yakni 23,98 ppm (Tabel 4). Berdasarkan uji statistik diketahui fosfat yang dilarutkan isolat TR1, TR2 dan TR4

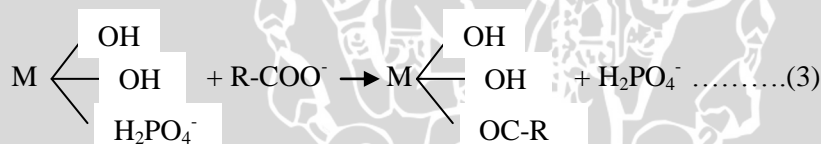
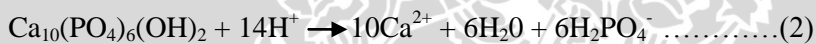
secara keseluruhan berbeda nyata ($P < 0,05$). Dapat diartikan bahwa kemampuan melarutkan fosfat ketiga isolat tersebut berbeda. Isolat TR1, TR2, dan TR4 memiliki kemampuan pelarutan fosfat yang rendah dibandingkan dengan penelitian Tripti dkk. (2012) yakni *Bacillus* sp. (S9) mampu melarutkan fosfat sebesar 122,36 ppm dengan indeks pelarut fosfat sebesar 1,6 dan *Pseudomonas* sp. (S14) sebesar 293,66 ppm dengan indeks pelarut fosfat sebesar 1,7.

Berdasarkan hasil uji korelasi diketahui bahwa indeks pelarut fosfat memiliki korelasi dengan jumlah fosfat yang terlarut dan korelasinya bersifat positif dengan koefisien korelasi sebesar 0,75 yang berarti bahwa semakin besar indeks pelarut fosfat maka semakin besar jumlah fosfat yang mampu dilarutkan dan korelasinya sangat kuat karena koefisien mendekati nilai 1. Menurut Arsyad (2007) indeks pelarut fosfat berkorelasi dengan kemampuan melarutkan fosfat. Semakin tinggi indeks, kemampuan mikroba pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat juga tinggi. Kemampuan pelarutan fosfat dapat pula dilihat dari luas zona bening yang dihasilkan bakteri. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat TR4 memiliki kemampuan paling besar dalam melarutkan fosfat. Pembentukan zona bening disebabkan karena aktivitas enzim fosfatase yang dihasilkan oleh bakteri (Goldstein, 1995). Kemasaman atau pH juga berpengaruh terhadap aktivitas fosfatase (Vepsäläinen dan Niemi, 2002).

Keasamaan (pH) masing-masing kultur bakteri dihitung setelah inkubasi selama 7 hari. Diketahui bahwa semua kultur isolat memiliki pH yang cenderung asam yakni antara 5,4 - 5,8. Penurunan pH diduga disebabkan adanya hasil metabolit dari bakteri berupa asam yang mempengaruhi pH media. Hal tersebut didukung oleh Tripti dkk. (2012) bahwa pH asam berkaitan dengan pelarutan fosfat dan kemungkinan dapat dikatakan sebagai mekanisme dari pelarutan fosfat. Bakteri pelarut fosfat mensekresikan asam berupa asam organik untuk melarutkan fosfat terikat dalam tanah. Banyaknya asam organik yang dihasilkan akan mempengaruhi pH media. Isolat TR1, TR2 dan TR4 diduga memiliki mekanisme yang sama yakni penggunaan asam organik untuk pelarutan fosfat.

Senyawa fosfat dalam bentuk organik berguna sebagai komponen utama DNA dan RNA inti sel, dalam bentuk ATP sebagai senyawa berenergi tinggi untuk metabolisme, sebagai fosfolipid yang

merupakan komponen membran sitoplasma dan kloroplas (Salisbury dan Ross, 1995). Sehingga dapat dikatakan fosfat merupakan senyawa penting bagi kehidupan organisme. Trikalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) dalam media *pikovskaya* mampu dimanfaatkan sebagai sumber fosfat bagi bakteri (Thakuria dkk., 2004). Bakteri pelarut fosfat akan menghasilkan asam organik. Meningkatnya asam organik akan diikuti dengan penurunan pH, sehingga mengakibatkan terjadinya pelarutan fosfat yang biasanya dalam bentuk terikat. Fosfat paling banyak terikat pada Fe, Al dan Ca yang biasa disebut dengan “khelat” (ikatan kompleks) dalam tanah. Pengikatan terhadap Fe, Al dan Ca sifatnya tergantung dari keasaman tanah. Penurunan pH juga dapat disebabkan akibat terbebasnya nitrat pada oksidasi ammonium. Pemecahan fosfat akan menghasilkan ion H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} yang merupakan bentuk fosfat yang mampu diserap oleh tanaman (Elfiati, 2005). Proses pelarutan fosfat akibat penurunan pH dan adanya gugus karboksilat dideskripsikan oleh Elfiati (2005) pada persamaan reaksi 2 dan 3.



M= Al^{3+} atau Fe^{3+}

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh pada penelitian ini adalah :

1. Terdapat empat isolat yang berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman Apel dan keempatnya yakni isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5 memiliki kemampuan dalam memfiksasi nitrogen dan menghasilkan IAA
2. Berkaitan dengan potensinya sebagai *biofertilizer* maka kemampuan keempat isolat dalam memfiksasi nitrogen, menghasilkan IAA dan melarutkan fosfat dipaparkan dalam tabel dibawah ini. Isolat yang paling berpotensi sebagai *biofertilizer* adalah TR1, TR4 dan TR5.

	TR1	TR2	TR4	TR5
Fiksasi Nitrogen	+	+	+	++
Produksi IAA	+++	+++	+++	+++
Pelarutan Fosfat	+	+	+	-

Keterangan : + = rendah

++ = sedang

+++ = tinggi

- = tidak ditemukan kemampuan

5.2 Saran

Penelitian ini perlu dilakukan optimasi produksi IAA guna mengetahui kondisi paling optimum bakteri untuk menghasilkan IAA. Selain itu perlu dilakukan uji antagonis antar isolat dan aplikasi pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, S.K. 2005. **Advanced Enviromental Biotechnology**. APH Publishing. New Delhi.
- Akhter, M.S, Hossain, S.J, Hossain, S.A dan Datta, R.K. 2012. Isolation and Characterzation of Salinity Tolerant Azotobacter sp. *Grenner Journal of Biological science*. 2 (3) : 43-51.
- Andanawarih,S. 2008. **Optimasi produksi Asam Indolasetat oleh *Rhizobium* sp. dalam medium serum lateks *hevea brasiliensis* dengan suplementasi triptofan**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Arkhipchenko I.A, Shaposhnikov A.I dan Kravcheno L.V. 2006. Triptophan concentration of animal waste and organic fertilizers.*Applied soil ecology*. 34 (1) : 62-64.
- Arsyad, R.H. 2007. Penggunaan *Rhizobium* dan Mikroba Pelarut Fosfat (MPF) untuk memperbaiki pertumbuhan bibit Akasia (*Acaci mangium* dan *Acacia crassicarpa*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Astuti, R.I , 2008. ***Pseudomonas* penghasil IAA**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ashraf, M.A, Rasool, M dan Mirza M.S. 2011. Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* I.). *Advances in Biological Research*. 6 : 348-355.
- Atlas, R.M. 2004. **Handbook of Microbiological Media 3rd edition volume 1**. CRC Press. Florida.
- Badan Perencanaan Pembangunan Daerah. 2009. **Rancangan Bangun Pengembangan Agribisnis Apel di Kota Batu**. Batu.
- Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molucelar Biology*. 48 : 51-66.
- Bergey, D.H, Holt, J.G, Krieg, N.R, Sneath, P.H,Staley, J.T, Williams, S.T. 1992. **Bergey's manual of determinative bacteriology Edisi 9**. Lippincot Williams & Wilkins. USA.
- Bettelheim, F., Brown, W., Campbell, M., Farrel, S dan Torres, O. 2012. **Introduction to general, organic and biochemistry**. Cengage learning. USA.
- Biswas, T.D dan Mukherjee, S.K. 2011. **Textbook of Soil Science**. Tata McGraw Hill Publishing Companies. New Delhi .

- Board, N. 2004. **The Complete Technology Book on Biofertilizer and Organic Farming**. National Institute of Industrial Re. New Delhi.
- BPS. 2010. **Kota Batu Dalam Angka Tahun 2010**. Batu.
- Bric, J.M , Bostock, R.M dan Silverstone, S.E. 1991. Rapid insitu assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. American Society for microbiology. *Applied and Enviromental Microbiology*.2 (57) : 535 – 538.
- Campbell, A, Reece, J.B dan Mitchell, L.G. 2004. **Biologi Jilid 3 Edisi 5**. Erlangga. Jakarta.
- Chen, Y.P, Rekha, P.D, Arun A.B, Shen F.T, Lai W.A dan Young C.C.2006. Phosphate Solubizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubizing abilities. *Applied soil ecology*. *Science direct*. 34 : 33-41.
- Chesworth, W. 2008. **Encyclopedia of Soil Science**. Springer. New York.
- Chopade, B.A. 2009. *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47 : 993-1000.
- Chung, K.R dan Tzeng, D.D. 2004. Biosyntheis of Indole-3-Acetic Acid by the Gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. *Journal of Biological Sciences*. 4 (6) :744-750.
- Cotton, F.A dan Wilkinson, G. 1988. **Kimia organik dasar**. Edisi 1. Terjemahan Suharto, S dan Koestoer, Y.R.A. 1989. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Darpan, P. 1999. Nitrogen cycle. *Competition Science Vision*. India
- Datta C. dan Basu, P.S. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiology Research*. 155 :123-127.
- Ditjen Cipta Karya. 2006. **Profil Kota Batu Jawa Timur**. <http://ciptakarya.pu.go.id/profil/profil/barat/jatim/batu.pdf>. Diakses tanggal 16 oktober 2013.
- Dobereiner, J, Baldani V.L.D dan Baldani, J.I .1995. How to isolation and identify diazotrophs in non legume plants. EMBRAPA – SPI. Brasilia.
- Elfiati, D. 2005. Peranan Mikroba Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan Tanaman. Universitas Sumatra Utara. Medan.

- Etesami, H., Alikhani, H.A dan Akbari, A.A. 2009. Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains *Application on Wheat Growth Indexes*. 6 (11) : 1576-1584.
- Febrianti ,T., Oedjijono dan Iriyanti, N. 2010. Kemampuan *Azospirillum* sp. JG3 dalam meningkatkan kandungan nutrisi ongok dan dedak dengan waktu inkubasi berbeda. Tesis. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Franché, C., K, Lindstrom dan C.Elmerich. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant soil*. 321 : 35-39.
- Gardner, F.P., R.B Pearce dan R.L Mitchell. 1991. **Fisiologi Tanaman Budidaya**. UI Press. Jakarta.
- Gillen, A.L. 2007. **The genesis of germs : the origin of disease and the coming plagues**. New leaf publishing group. Arkansas.
- Giller, K.E. 2001. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CABI. United Kingdom.
- Goldstein, A.H. 1995. Recent Progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*. 12 : 185-193.
- Graham, L.E , Graham ,J.M dan Wilcox , L.W. 2006. **Plant Biology Second Edition**. Pearson Prentice Hall. New Jersey.
- Greeners. 2010. Perubahan Suhu Udara Pengaruhi Produktifitas Apel batu. <http://www.greenersmagz.com/dailyten/perubahan-suhu-udara-pengaruh-produktifitas-apel-batu/>. Diakses tanggal 16 oktober 2013.
- Gunalan. 1996. Penggunaan Mikroba Bermanfaat Pada Bioteknologi Tanah Berwawasan Lingkungan. Sriwijaya. Surabaya.
- Gusninar.2007. Produksi IAA oleh *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* spp. dan *Azobacter* sp. dalam medium sintetik dan serum lateks *Hevea brasiliensis* Muel. Arg dengan suplementasi triptofan. Skripsi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Hamdiyati, Y. 2011. Pertumbuhan dan Pengendalian Mikroorganisme II.http://file.upi.edu/Direktori/FPMIPA/JUR._PEND._BIOLOGI/196611031991012YANTI_HAMDIYATI/Pertumbuhan_pada_mikroorganisme_II.pdf. Diakses 11 Desember 2014.

- Hidayat, A.T. 2009. Potensi Pelepasan $N-NH_4^+$ dan $N-NO_3^-$ Tanah andisol yang ditanami sayuran di daerah dataran tinggi. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Holding, A.J. 1950. The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 515-525.
- Hong, C.W., 1994. Organic Farming and The Sustainability of Agriculture in Korea. Papers Delivered at 12th Meeting of The Technical Advisory Committee of The Food and Fertilizer Technology Center for The Asian and Pacific Region. Taiwan.
- Indahwati, R. 2010. Pengaruh Sistem Pertanian Ramah Lingkungan Terhadap Kualitas Tanah Pada Lahan Apel di Kelompok Tani Makmur Abadi, Tulungrejo, Bumiaji, Kota Batu. Tesis. Universitas Diponegoro. Bandung.
- Jaeger, C.H., S.E Lindow, W. Miller, E.Clark dan M.K Firestone. 1999. Mapping of sugar and amino acid avibility in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Application Enviromental Microbiology.* (65) : 90-2685.
- Jolly, S.N., Shanta , N.A dan Khan, Z.U.M. 2010. Quantification of Heterotrophic Bacteria and *Azospirillum* from the rhizosphere of Taro (*Colocasia esculenta* L.Schott.) and the nitrogen fixing potential of isolated *Azospirillum*. *International Journal of Botany.* 2 (6): 117 – 121.
- Kelly, R.K. 2005. The Rhizosphere. http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0004/42259/Rhizosphere.pdf. Diakses tanggal 23 September 2013.
- Khan, M.S., Zaidi, A. dan Musarrat,J. 2009. **Microbial Strategies for Crop Improvement**. Springer. New York.
- Khan, M.S. Zaidi, A. dan Mussarat, J. 2010. **Microbes for Legume Improvement**. Springer. New York.
- Khan, A.A, G, Jilani, M.S Akhtar, S.M.S Naqvi, M.Rasheed. 2009. Phosphorus solubizing bacteria : Occurrence, meachanisms and their role in crop production. *J.Agric.Biol.Sci.* 1 : 48-58.
- Kirchman, D.L. 2012. **Processes in Microbial Ecology**. Oxford University Press ,Inc. New York.
- Kizilkaya, R. 2009. Nitrogen Fixation Capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated form soils in different ecosystems and

- relationship between them and the microbiological properties of soils. *Journal of Enviromental Microbiology*. 1 (30) :73-82.
- Kota Wisata Batu. 2012. Apel dan Pemberdayaan Petani. <http://www.kotawisatabatu.com/ekonomi-bisnis/145-apel-dan-pemberdayaan-petani>. Diakses tanggal 23 September 2013.
- Latt, Z.K., Yu, S.S dan Lynn, T.M. 2013. Enhancement of Cellulolytic Nitrogen Fixing Activity of *Alcaligenes* sp. by MNNG Mutagenesis. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 4 (3): 979 - 986.
- Lambers, H., Chapin, F.S dan Pons, T.L. 1998. **Plant physiological ecology**. Springer. New york .
- Lugtenberg, B. dan Kamilova, F. 2009. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63 : 541- 556.
- Madigan. M.T. , Martinko, J.H. , Parker , J. 2003. **Brock Biology of Microorganism Tenth Edition**. Pearson Education, Inc. USA.
- Maheshwari, D.K. 2011. **Bacteriain Agrobiology : Crop Ecosystems**. Springer Science & Business Media. New York.
- Maheshwari, D.K. 2012. **Bacteria in Agrobiology : Plant Nutrient Management**. Springer Science & Business Media. New York.
- Mubarikf, N.R.I. , Mahagiani, A., Anindyaputri, S., Santoso, I., Rusmana. 2010. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere : chitnase characterzation and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) *Am. J.Agric. Biol. Sci*. 5 : 430-435 .
- Metasari, K. 2012. Eksplorasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiosis dari Tanah Kawasan Mangrove Wonorejo Surabaya. <http://biologi.fst.unair.ac.id/wpcontent/uploads/2012/04/EKSPLORASIBAKTERIPENAMBATNITROGENNONSIMBIOSIS.pdf>. Diakses 2 Juni 2014.
- Nabti, E., Sahnoune , M., Adjrad, S., Dommelen, A.V., Ghoul, M., Schmid, M. dan Hartmann, A. 2007. A Halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* strain from Algerian soil restores wheat growth under saline conditions. *Eng. Life Science*. 4 (7) : 354-360.
- Neeru, N, K, Vivek, K.Rishi dan M, Wolfgancy. 2000. Effect of P-solubizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in p-

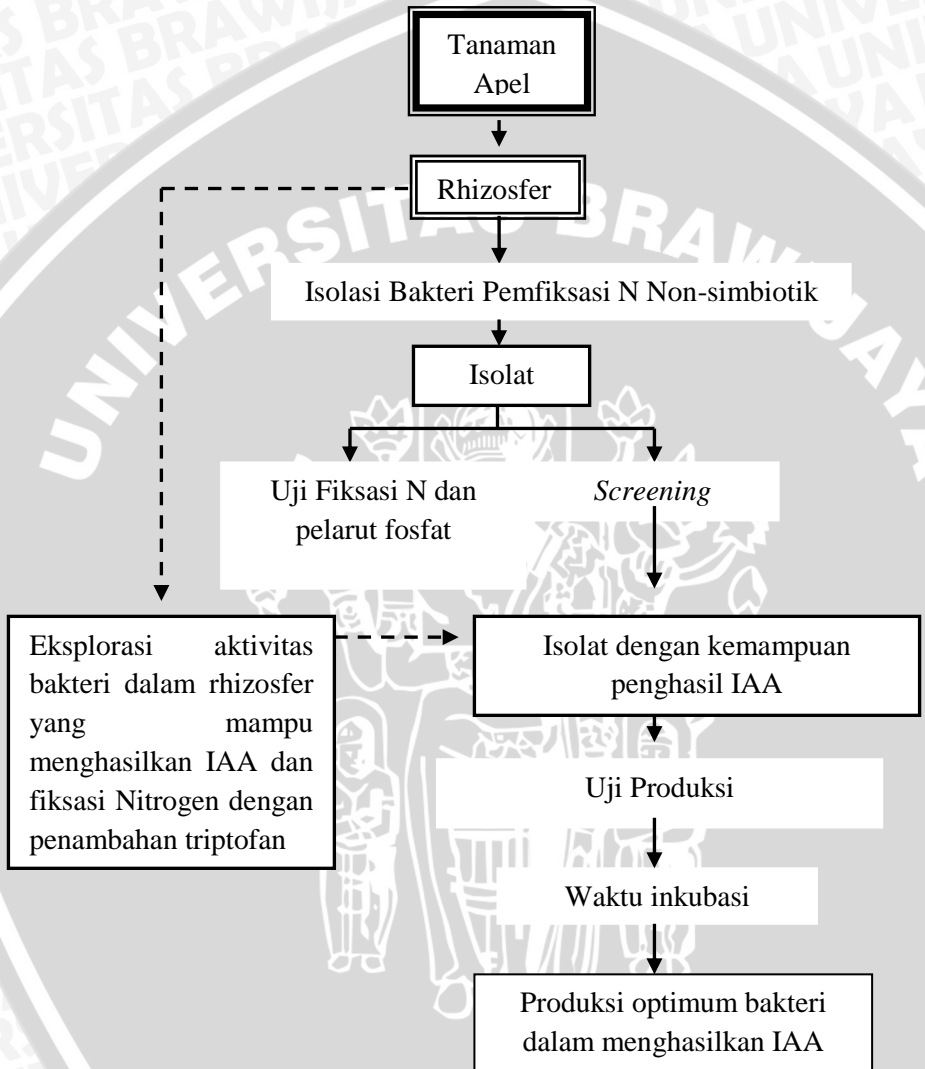
- responsive genotypes grown under greenhouse condition. *J. Plant Nutrition Soil Science*. 16 : 393-398.
- Ningsih, R.D . 2003. Ekspresi Asam Indol Asetat (IAA) *Rhizobium* Rekayasa Genetika RD-20 dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan dan Serapan Hara Tanaman Kacang - Kacangan. Tesis . Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nugraha, R., Ardyati, T dan Suharjono. 2014. Eksplorasi bakteri selulolitik yang berpotensi sebagai agen *biofertilizer* dari tanah perkebunan Apel Kota Batu, Jawa Timur. *Biotropika*. 3 (2) :159-163.
- Nurhayati, H. 2006. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penambat Nitrogen Non simbiotik dari Lahan Kering Asam. Skripsi. Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Nurkanto, A. 2007. Identifikasi aktinomisetes tanah hutan pasca kebakaran bukir bangkirai kalimatan timur dan potensinya sebagai pendegradasi selulosa dan pelarut fosfat. *Biodiversitas*. 4 (8) : 314-319.
- Patel, H.A, Patel, R.K, Khristi, S.M, Parikh dan Rajendran, G. 2012. Isolation and Characterzation of Bacterial Endophytes From *Lycopersico esculentum* Plant and Their Plant Growth Promoting Characteristics. *Nepal Journal of Biotechnology*.1 (2) : 37-52.
- Patten, C.L dan Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. American Society for Microbiology. *Applied and Enviromental Microbiology*. 8 (68) : 3795-3801.
- Patten, C.L dan Glick, B.R. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can J microbial*. 48 (7) : 42-635.
- Pepper, I.L, Gerba, C.P, Gentry T.J dan Maier R.M. 2011. **Enviromental Microbiology**. Academic Press. USA.
- Pepper, I.L., Gerba, C.P dan Gentry, T.J. 2014. **Enviromental Microbiology**. Elsevier. Amsterdam.
- Perwitasari, R. 2008. Respon Pertumbuhan Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Pemberian IAA (Auksin Alami) dan NAA (Auksin Sintetik). Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.

- Prakash, P. dan Karthikeyan, B. 2013. Isolation and Purification of Plant growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) from the Rhizosphere of *Acorus calamus* grown soil. *Indian Streams Research Journal*. 7 (3) : 1-11.
- Prihastuti. 2011. Struktur komunitas mikroba tanah dan implikasinya dalam mewujudkan sistem pertanian berkelanjutan. Balai penelitian tanaman kacang-kacangan dan Umbi-umbian. *El Hayah*. 1 (4) : 174-181.
- Rahayu, L.O. 2003. Pengaruh Konsorsium Bakteri *Azospirillum* PAK-2, *Azotobacter* ZBL-05 dan *Phosphate Solubilizing Bacteria* terhadap kadar IAA (*Indole Acetic Acid*) Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) Varietas Ciherang Fase Perkecambahan. Skripsi . Universitas Brawijaya. Malang.
- Rao, N.S.S. 2001. **Soil Microbiology (4th edition of soil microorganisms and plant growth)**. Science Publishers, Inc. USA.
- Ranjan, A. , Mahalakshmi, M.R dan Sridevi, M. 2014. Isolation and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacterial Species From Different Crop Fields of Salem, Tamil Nadu, India. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 1 (3) : 29-33.
- Raven, P.H., Evert, S.E dan Eichhorn. 2005. **Biology of Plants 7th Edition**. W.H Freeman and Company Publishers. New York.
- Retnowati, Y. Uni, W.D dan Putri, S.H.E. 2012. Potensi Penghasilan Hormon IAA oleh Mikroba Edofit Akar Tanaman Jagung (*Zea mays*). *Sainstek*. 6 (6) : 1-11.
- Rfaki , A., Nassiri, L. dan Ibijbijen, J. 2014. Phosphate-Solubilizing Bacteria in the Rhizosphere of Some Cultivated legumes from Meknes region, Morocco. *British biotechnology Journal*. 4 (9): 947-956.
- Sachdev, D.P, Chaudhari, H.G, Kasture, V.M, dhavale, D.D dan Chopade, B.A. 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumonia* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian Journal of Experimental Biology*. (47) : 993-1000

- Sahasrabudhe, M.M. 2011. Screening of Rhizobia for Indole Acetic Acid Production. *Annals of Biological research* . 2 (4) : 460-468.
- Salisbury, F.B dan Ross C.W. 1995. **Fisiologi Tumbuhan**. Penerbit ITB. Bandung.
- Saupe, G.S. 2007. Plant physiology. College of St.benedict/St. John's University. Biology department.Collegeville.
- Sudha, M., Gowri, R.S , Prabhawathi, P. , Astapriya, P. , Devi, S.Y dan Saranya A. 2012. Production and Optimization of Indole Acetic Acid by Indigenous Micro Flora Using Agro Waste as Substrate. *Pakistan Journal of Biological Science*. 15 (1) : 39 - 43.
- Suhariyono, Sutopo dan Suratman. 2010. **Pewilayahan Tanaman Apel di Jawa Timur**. Balitjestro. Batu .
- Simanungkalit, R.D.M. 2001. **Aplikasi Pupuk Hayati dan Pupuk Kimia Pendekatan Terpadu**. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor
- Simanungkalit, R.D.M, Saraswati , R. , Hastuti, R.D dan Husen E. 2009. **Bakteri Penambat Nitrogen**. Balai Penelitian Tanah. Bogor.
- Singh,P. Kumar,V dan Agrawal, S. 2014. Evaluation of Phytase Producing Bacteria for Their Plant Growth Promoting Activities.<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2014/426483/>. Diakses 26 November 2014.
- Soenandar, M. , Aeni , M.N dan Raharjo A. **Petunjuk Praktis Membuat Pestisida Organik**. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Spaepen, S. , Vanderleyden, J. dan Remans, R. 2007. Indole Acetic Acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* : 1-24.
- Spaepen,S dan Vanderleyden, J. 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stenvenson F.J dan Cole, M.A.1999. **Cycles of Soils : Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients**. John Wiley and Sons. New york.
- Sylvia, D. M, Fuhrmann, J.J, Hartel P.G dan Zuberer, D.A. 1999. **Principles and applications of soil microbiology**. Prentice Hall. New Jersey.

- Taiz, L. dan Zeiger, E. 2010. **Plant Physiology Fifth Edition**. Sinauer Associates. Sunderland.
- TamilNadu Agricultural university (TNAU). 2008. Organic Farming : Biofertilizers Technology. http://agritech.tnau.ac.in/org_farm/orgfarm_biofertilizertechology.html. Diakses 21 Oktober 2013.
- Thakuria, D., Talukdar, N.C, Goswami, C., Hazarika, S., Boro, R.C dan Khan , M.R. 2004. Charcterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*. 7 (86) : 978-985.
- Tribun Jatim. 2012. **Apel Impor Matikan Apel Malang**. <http://jatim.tribunnews.com/2012/10/24/apel-impor-matikan-apel-malang>. Diakses 16 oktober 2013.
- Tripti, Kumar, V. dan Anshumali. 2012. Phosphate Solubizing Activity of Some Bacterial Strains Isolated from Chemical Pesticide Exposed Agriculture Soil. *International Journal of Enggining research and Development*. 3 (9) : 1-6.
- Tuteja, N. dan Gill, S.S. 2012. **Plant Acclimation to enviromental stress**. Springer. New York.
- Vadakattu , G. dan Paterson , J. 2006. Free-living bacteria lift soil nitrogen supply. *Farming ahead*. 40:169.
- Vepsalainen, M. dan Niemi, R.M. 2002. pH optima of enzyme activities in different soils. Poster presentation in Symposium no.12. 17th WCSS. Thailand
- Wahyudi, A.T. , Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A. dan 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*. 2 (3) : 34 – 40.
- Wedhastri, S., Prahastiwi, Y., Widada, J., Widiyanto, D. dan Kabirun, S. 2013. The diversity of Legume-Nodulating bacteria from Several Agroecosystems in Sumberjaya, Lampung. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 1 (18) : 64-69.
- Yulianti S., Irlansyah, Junaedi, E. dan Mutafis W. 2005. **Khasiat dan Manfaat Tanaman Apel**. Agromedia. Jakarta.
- Zhou, Y. dan Gottesman S. 1998. Regulation of proteolysis of the ststionary-phase sigma factor RpoS. *J.bacteriol*. 180 (5) : 8-1154.

KERANGKA OPERASIONAL



LAMPIRAN

1. Komposisi Media NFB (*Nitrogen Free Bromothymol Blue*)
(Dobereiner, 1995) :

K_2HPO_4	0,5 gram
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,015 gram
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 gram
NaCl	0,1 gram
DL –Malic Acid	5 gram
KOH	4,8 gram
Bromotimol blue 0,1 %	10 ml
Agar	3 gram (semi solid)
Akuades	20 gram (solid)
pH	1000 ml
	6,5 – 7,2

2. Komposisi Reagen Salkowski (Patten and Glick, 2002) :

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1,5 M	7,5 ml
H_2SO_4	150 ml
Akuades	250 ml

3. Komposisi media Luria Bertani *Broth* (Atlas, 2004) :

Tripton	10 gram
<i>Yeast extract</i>	5 gram
NaCl	10 gram
Akuades	1000 ml

4. Komposisi media *Pikovskaya Agar* (Nurkanto, 2007):

Glukosa	10 gram
$Ca_3(PO_4)_3OH$	5 gram
$(NH_4)SO_4$	0,5 gram
KCl	0,2 gram
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 gram

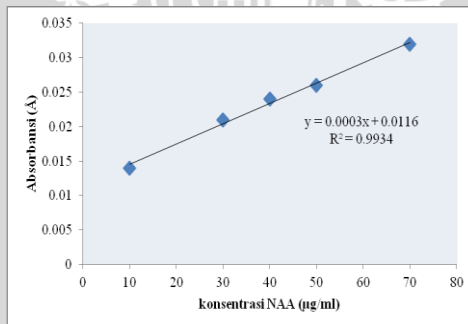
Mn.SO ₄ H ₂ O	2,5 mg
Fe.SO ₄ .7H ₂ O	2,5 mg
Yeast Extract	0,5 gram
Agar	15 gram
Akuades	1000 ml

5. Komposisi Pereaksi P- reagen *Mo-blue* (Murphey dan Riley, 1962)

H ₂ SO ₄ 5 N	124 ml
Ammonium molybdate	37,5 ml
Asam Askorbat 0,1 M	75 ml
Potassium tartarate	12,5 ml

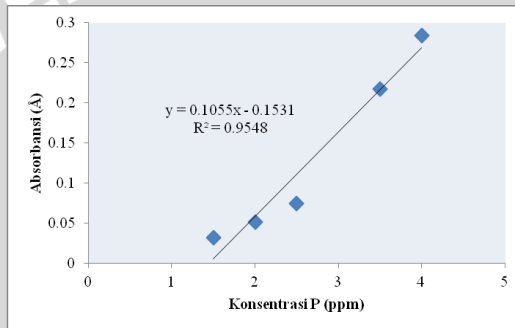
6. Pembuatan Kurva Baku IAA

Kurva baku IAA didapatkan dengan cara disiapkan larutan stok dengan cara melarutkan 100 mg NAA (IAA sintetik) dalam 100 ml akuades, diaduk dan ditetesi dengan NaOH 1 N hingga larutan menjadi bening sehingga diperoleh stok NAA 1000 µg/ml. Kurva baku IAA dibuat dengan berbagai konsentrasi (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µg/ml) sebanyak 1 ml. Larutan NAA ditambahkan reagen Salkowski sebanyak 2 ml, dihomogenasi dan diinkubasi selama ± 60 menit di suhu ruang, keadaan gelap. Setelah ± 60 menit masing-masing larutan NAA diukur absorbansinya dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 530 nm (Modifikasi Patel dkk., 2012).

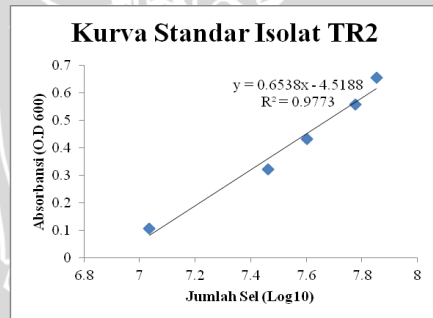
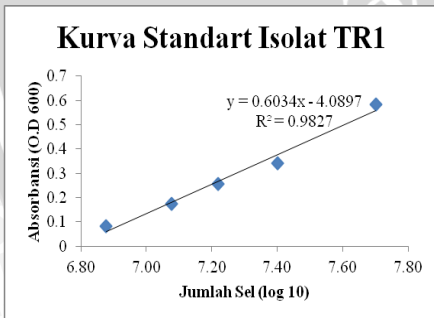


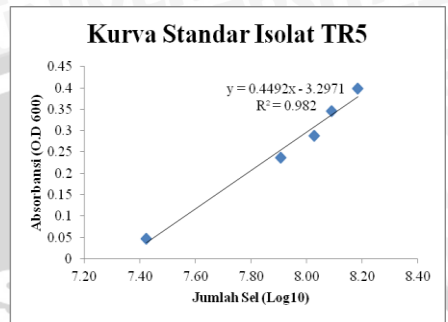
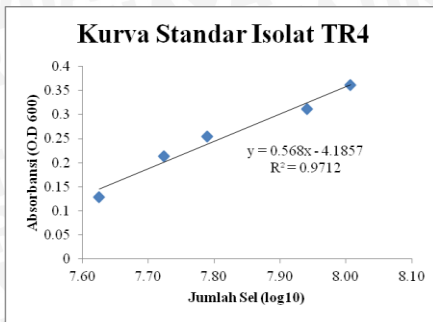
7. Pembuatan Kurva Baku fosfat

Kurva baku fosfat didapatkan dengan cara pertama dipersiapkan larutan stok pospat (KH_2PO_4) dengan konsentrasi 50 ppm (50 mg dalam 1000 ml akuades dan diaduk hingga larut). Kurva baku fosfat dibuat dengan berbagai konsentrasi (0 – 4,5 ppm) sebanyak 5 ml. Larutan pospat standar ditambahkan dengan reagen *mo blue* sebanyak 2 ml, dihomogenasi dan diinkubasi selama \pm 30 menit di suhu ruang. Setelah \pm 30 menit masing – masing larutan fosfat standar diukur absorbansinya dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 693 nm.



8. Kurva Standar Isolat TR1, TR2, TR4, TR5





9. Analisis Statistik

9.1 Produksi IAA oleh Isolat TR1

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi_ IAA
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	502.1108
	Std. Deviation	313.61294
Most Extreme Differences	Absolute	.350
	Positive	.195
	Negative	-.350
Kolmogorov-Smirnov Z		1.211
Asymp. Sig. (2-tailed)		.106
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

konsentrasi_IAA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.898	3	8	.102

ANOVA

konsentrasi_IAA	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1081157.694	3	360385.898	3.970E3	.000
Within Groups	726.141	8	90.768		
Total	1081883.835	11			

Homogeneous Subsets

konsentrasi_IAA

JAM_KE	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey jam 0	3	.0000			
HSD ^a Jam 24	3		5.8356E2		
jam 72	3			6.3133E2	
jam 48	3				7.9355E2
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

9.2 Produksi IAA oleh Isolat TR2

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi_IAA
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	210.9992
	Std. Deviation	160.77236
Most Extreme Differences	Absolute	.234
	Positive	.155
	Negative	-.234
Kolmogorov-Smirnov Z		.810
Asymp. Sig. (2-tailed)		.529
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

konsentrasi_IAA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.644	3	8	.064

ANOVA

konsentrasi_ IAA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	281999.875	3	93999.958	323.384	.000
Within Groups	2325.407	8	290.676		
Total	284325.282	11			

Homogeneous Subsets

konsentrasi_ IAA					
JAM_KE	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey	jam 0	3	.0000		
HSD ^a	Jam 24	3		1.3467E2	
	jam 72	3		3.2022E2	
	jam 48	3			3.8911E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

9.3 Produksi IAA oleh Isolat TR4

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi_IAA
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	194.3342
	Std. Deviation	148.61549
Most Extreme Differences	Absolute	.169
	Positive	.169
	Negative	-.153
Kolmogorov-Smirnov Z		.586
Asymp. Sig. (2-tailed)		.882
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

konsentrasi_IAA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.585	3	8	.267

ANOVA

konsentrasi_IA A					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	236485.296	3	78828.432	97.516	.000
Within Groups	6466.911	8	808.364		
Total	242952.207	11			

Homogeneous Subsets

konsentrasi_IAA					
JAM_KE	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Tukey HSD ^a jam 0	3	.0000			
Jam 24	3		1.9022E2		
jam 72	3		1.9022E2		
jam 48	3			3.9689E2	
Sig.		1.000	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

9.4 Produksi IAA oleh Isolat TR5

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi_IAA
	N	12
Normal Parameters ^a	Mean	152.1117
	Std. Deviation	143.85670
	Most Extreme Differences	
	Absolute	.215
	Positive	.215
	Negative	-.145
Kolmogorov-Smirnov Z		.744
Asymp. Sig. (2-tailed)		.636
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

konsentrasi_IAA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.045	3	8	.006

ANOVA

konsentrasi_ IAA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	172827.590	3	57609.197	8.408	.007
Within Groups	54814.674	8	6851.834		
Total	227642.264	11			

Post Hoc Tests

Games-Howell	jam 0	jam 24	jam 48	jam 72				
		-90.22333'	-196.89000	-321.33333'	12.37361	.045	-175.9510	-4.4957
			92.02082	22.69010	.372		-834.4347	440.6547
					.012		-478.5364	-164.1303
	Jam 24	90.22333'	-106.66667	-231.11000'	12.37361	.045	4.4957	175.9510
			92.84901	25.84467	.703		-725.2980	511.9647
					.008		-353.2559	-108.9641
	jam 48	196.89000	106.66667	124.44333	92.02082	.372	-440.6547	834.4347
			92.84901	94.77696	.703		-511.9647	725.2980
					.629		-706.7481	457.8614
	jam 72	321.33333'	231.11000'	124.44333	22.69010	.012	164.1303	478.5364
			25.84467		.008		108.9641	353.2559
					.629		-457.8614	706.7481

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Subset

	0	24	48	72
0		s	n	s
24	s		n	s
48	n	n		n
72	s	s	n	

Notasi

Jam ke-0	a
Jam ke-24	b
Jam ke-48	c
Jam ke-72	c

9.5 Produksi IAA oleh isolat bakteri jam ke-24, 48 dan 72

9.5.1 Jam ke-24

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		IAA
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	2.4967E2
	Std. Deviation	2.05655E2
Most Extreme Differences	Absolute	.298
	Positive	.298
	Negative	-.197
Kolmogorov-Smirnov Z		1.034
Asymp. Sig. (2-tailed)		.236
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances			
IAA			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.239	3	8	.161

ANOVA

IAA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	460989.656	3	153663.219	289.618	.000
Within Groups	4244.578	8	530.572		
Total	465234.233	11			

Homogeneous Subsets

IAA					
Jenis_iso		N	Subset for alpha = 0.05		
lat					
		1	2	3	
Tukey HSD ^a	TR5	3	90.2233		
	TR2	3	1.3467E2	1.3467E2	
	TR4	3		1.9022E2	
	TR1	3			5.8356E2
	Sig.		.162	.071	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

9.5.2 Jam ke-48

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		IAA
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	4.4411E2
	Std. Deviation	2.37357E2
Most Extreme Differences	Absolute	.277
	Positive	.277
	Negative	-.202
Kolmogorov-Smirnov Z		.960
Asymp. Sig. (2-tailed)		.316
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances			
IAA			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.247	3	8	.008

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IAA

	(I) Jenis isolat	(J) Jenis isolat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	TR1	TR2	404.44333 [*]	67.25153	.001	189.0803	619.8064
		TR4	396.66333 [*]	67.25153	.002	181.3003	612.0264
		TR5	596.66333 [*]	67.25153	.000	381.3003	812.0264
	TR2	TR1	-404.44333 [*]	67.25153	.001	-619.8064	-189.0803
		TR4	-7.78000	67.25153	.999	-223.1431	207.5831
		TR5	192.22000	67.25153	.081	-23.1431	407.5831
	TR4	TR1	-396.66333 [*]	67.25153	.002	-612.0264	-181.3003
		TR2	7.78000	67.25153	.999	-207.5831	223.1431
		TR5	200.00000	67.25153	.069	-15.3631	415.3631
	TR5	TR1	-596.66333 [*]	67.25153	.000	-812.0264	-381.3003
		TR2	-192.22000	67.25153	.081	-407.5831	23.1431
		TR4	-200.00000	67.25153	.069	-415.3631	15.3631
Games-Howell	TR1	TR2	404.44333 [*]	15.59396	.000	332.2899	476.5968
		TR4	396.66333 [*]	19.87566	.002	292.9863	500.3403
		TR5	596.66333 [*]	92.34902	.056	-33.1179	1226.4446
	TR2	TR1	-404.44333 [*]	15.59396	.000	-476.5968	-332.2899
		TR4	-7.78000	22.74190	.984	-104.4515	88.8915
		TR5	192.22000	93.00803	.383	-423.0279	807.4679
	TR4	TR1	-396.66333 [*]	19.87566	.002	-500.3403	-292.9863
		TR2	7.78000	22.74190	.984	-88.8915	104.4515
		TR5	200.00000	93.82092	.362	-399.0909	799.0909
	TR5	TR1	-596.66333 [*]	92.34902	.056	-1226.4446	33.1179
		TR2	-192.22000	93.00803	.383	-807.4679	423.0279
		TR4	-200.00000	93.82092	.362	-799.0909	399.0909

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

	TR5	TR2	TR4	TR1
TR5		n	n	n
TR2	n		n	s
TR4	n	n		s
TR1	n	s	s	

Notasi

TR1	c
TR2	a
TR4	ab
TR5	abc

9.5.3 Jam ke-72

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		IAA
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	3.6578E2
	Std. Deviation	1.71089E2
Most Extreme Differences	Absolute	.276
	Positive	.276
	Negative	-.180
Kolmogorov-Smirnov Z		.956
Asymp. Sig. (2-tailed)		.321
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

IAA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.104	3	8	.178

ANOVA

IAA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	316169.807	3	105389.936	144.982	.000
Within Groups	5815.341	8	726.918		
Total	321985.148	11			

Homogeneous Subsets

IAA

Jenis_iso lat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey B ^a TR4	3	1.9022E2		
TR2	3		3.2022E2	
TR5	3		3.2133E2	
TR1	3			6.3133E2

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

9.6 Indeks Pelarut Fosfat Isolat TR1, TR2, TR4

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Indeks_pelarut_fosfat
N		9
Normal Parameters ^a	Mean	1.1381
	Std. Deviation	.07144
Most Extreme Differences	Absolute	.320
	Positive	.320
	Negative	-.186
Kolmogorov-Smirnov Z		.959
Asymp. Sig. (2-tailed)		.317
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

Indeks_pelarut_fosfat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.314	2	6	.180

ANOVA

Indeks_pelarut_fosfat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.021	2	.010	3.054	.122
Within Groups	.020	6	.003		
Total	.041	8			

Homogeneous Subsets

Indeks_pelarut_fosfat			
		Subset for alpha = 0.05	
	Isolat	N	1
Tukey HSD ^a	TR2	3	1.0900
	TR1	3	1.1209
	TR4	3	1.2033
	Sig.		.117

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

9.7 Fosfat terlarut oleh Isolat TR1, TR2, TR4

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlah_p_terlarut
N		9
Normal Parameters ^a		
	Mean	27.90111
	Std. Deviation	3.220883
Most Extreme Differences		
	Absolute	.233
	Positive	.214
	Negative	-.233
Kolmogorov-Smirnov Z		.699
Asymp. Sig. (2-tailed)		.712
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

jumlah_p_terlarut

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.606	2	6	.094

ANOVA

jumlah_p_terlarut

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	81.315	2	40.657	145.390	.000
Within Groups	1.678	6	.280		
Total	82.993	8			

Homogeneous Subsets

jumlah_p_terlarut

isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a TR2	3	2.39800E 1		
TR1	3		2.84400E 1	
TR4	3			3.12833E 1
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

9.7 Korelasi Indeks pelarut fosfat dengan fosfat terlarut

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		fosfat_terlarut	Indeks_pelarut_fosfat
N		9	9
Normal	Mean	27.8678	1.1381
Parameters ^a	Std. Deviation	3.19357	.07144
Most Extreme	Absolute	.238	.320
Differences	Positive	.214	.320
	Negative	-.238	-.186
Kolmogorov-Smirnov Z		.713	.959
Asymp. Sig. (2-tailed)		.689	.317
a. Test distribution is Normal.			

Correlations

Correlations

		Indeks_pelarut_fosfat	fosfat_terlarut
		fat	fosfat_terlarut
Indeks_pelarut_fosfat	Pearson Correlation	1	.758*
	Sig. (2-tailed)		.018
	N	9	9
fosfat_terlarut	Pearson Correlation	.758*	1
	Sig. (2-tailed)	.018	
	N	9	9

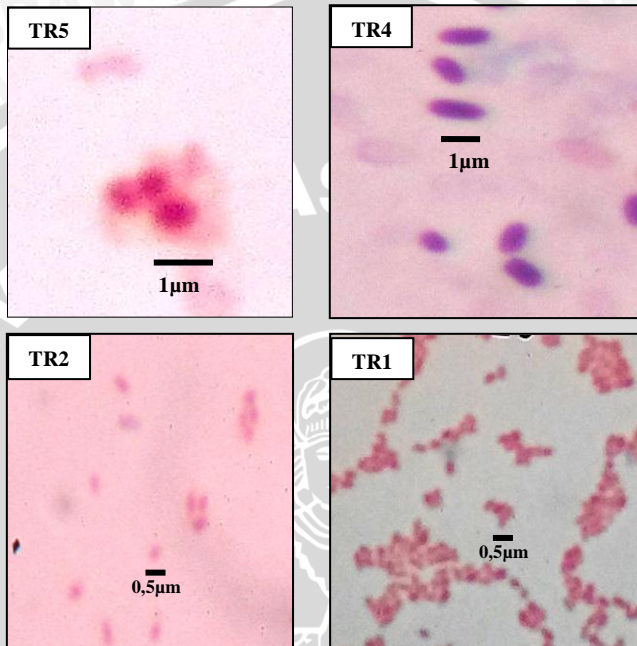
Correlations

		Indeks_pelarut_fosfat	fosfat_terlarut
Indeks_pelarut_fosfat	Pearson Correlation	1	.758*
	Sig. (2-tailed)		.018
	N	9	9
fosfat_terlarut	Pearson Correlation	.758*	1
	Sig. (2-tailed)	.018	
	N	9	9

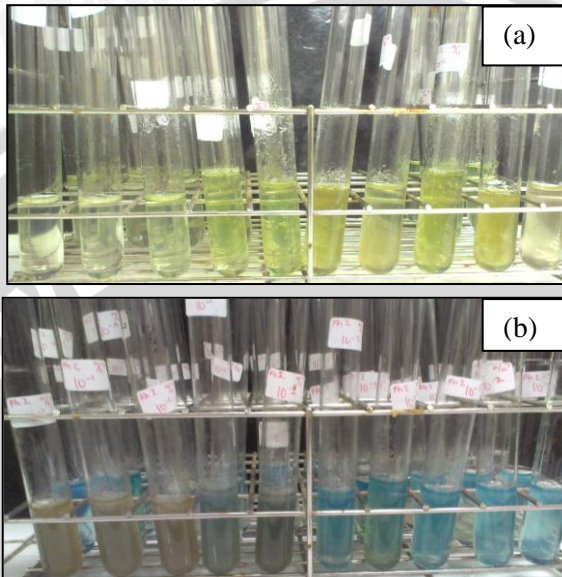
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



LG1. Pewarnaan Gram isolat bakteri pemfiksasi bitrogen dari rhizosfer tanaman Apel Kota Batu (1000 x)



LG2. Perubahan warna media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (Nfb) *semi solid* sebelum (a) dan sesudah inkubasi selama 5-6 hari (b)



LT1. Jumlah sel (sel/mL) isolat bakteri pada media produksi IAA

	Jam ke-			
	0	24	48	72
TR1	10^7	$10,33 \times 10^9$	$22,51 \times 10^9$	$22,51 \times 10^9$
TR2	10^7	$6,47 \times 10^9$	$19,10 \times 10^9$	$18,31 \times 10^9$
TR4	10^7	$74,89 \times 10^9$	$195,7 \times 10^9$	$207,1 \times 10^9$
TR5	10^7	$915,1 \times 10^9$	$1857,6 \times 10^9$	$784,6 \times 10^9$

LT2. Konsentrasi IAA yang dihasilkan isolat TR1, TR2, TR4 dan TR5

	Konsentrasi IAA ($\mu\text{g/ml}$) jam ke -			
	0	24	48	72
TR1	0	583,55	793,55	631,33
TR2	0	134,66	389,11	320,22
TR4	0	190,22	396,88	190,22
TR5	0	90,22	196,88	321,33

LT3. Perhitungan Parameter Lingkungan Perkebunan Apel Organik di Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu

Ketinggian	1592 mdpl
Suhu Tanah	21 °C
Suhu Udara	20 °C
Kelembaban Tanah Rhizosfer	68 %
Kelembaban Udara	80 %
pH Rhizosfer	5,9
Intensitas Cahaya	251 Lux
Bahan Organik Rhizosfer	48 %
Umur Pohon	5,5 tahun
Luas Kanopi	139,6 cm
Lingkar Pohon	24,6 cm

LT4. Karakter Morfologi Koloni Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dari Rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu

Karakter	TR₁	TR₂	TR₄	TR₅
- Tak Beraturan	+	-	+	-
- Bulat	-	+	-	+
- Beralun	+	-	+	-
- Menyeluruh	-	+	-	+
- Cembung	+	+	-	+
- Datar	-	-	+	-
- Berkontur	+	+	+	+
- Mentega	+	+	+	+
- Berkilat	+	-	-	+
- Opalesens	-	+	-	-
- Pudar	-	-	+	-
- Kream	+	-	+	-
- Tak bewarna	-	+	-	-
- Kuning	-	-	-	+
- Positif	-	-	+	-
- Negatif	+	+	-	+
- Kokus	-	-	-	-
- Batang	+	+	+	+
Panjang sel	0,5 µm	0,5 µm	1 µm	1 µm

Keterangan : + (ya), - (tidak)