

Isolasi dan uji aktivitas bakteri penghasil hormon tumbuh IAA (Indole-3-Acetic Acid) dan Bakteri Perombak Protein dari Tanah Pertanian Tual, Maluku Tenggara

Isolation and activity test of IAA and protease producing bacteria from Tual Agricultural Land, Southeast Maluku

TIRTA KUMALA DEWI^{1*}, JODI SURYANGGONO², DWI AGUSTIYANI¹

¹Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-87907636, Fax.: +62-21-87907612, *email: tirta.kdewi@gmail.com

²Fakultas Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman. Jl. Dr. Soeparno No.63 Karangwangkal, Grendeng, Purwokerto 53122, Banyumas, Jawa Tengah.

Manuskrip diterima: 31 Agustus 2016. Revisi disetujui: 27 Desember 2016.

Abstrak. Dewi TK, Suryanggono J, Agustiyani D. 2016. Isolasi dan uji aktivitas bakteri penghasil hormon tumbuh IAA (Indole-3-Acetic Acid) dan Bakteri Perombak Protein dari Tanah Pertanian Tual, Maluku Tenggara. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 271-276. Tanah pertanian yang terletak di daerah Tual, Maluku Tenggara memiliki keragaman mikrobaa dengan berbagai aktivitas antara lain penghasil hormon tumbuh IAA (Indole -3-Acetic acid) dan perombak protein. Bakteri yang mampu menghasilkan IAA dapat meningkatkan pertumbuhan dan perpanjangan akar sehingga permukaan akar menjadi lebih luas dan akhirnya tanaman mampu menyerap nutrisi dari dalam tanah lebih banyak. Bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease memiliki kemampuan untuk mengurai atau menghilangkan protein kompleks pada lingkungan yang tercemar sehingga dapat berperan dalam bioremediasi lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan uji aktivitas bakteri penghasil hormon tumbuh IAA dan bakteri perombak protein dari Ohoitel, Kota Tual, Maluku Tenggara. Isolasi dan seleksi dilakukan dengan metode TPC (Total plate count) pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan skim milk agar. Uji aktivitas bakteri penghasil IAA dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Metode yang digunakan adalah spektrofotometri pada panjang gelombang 530 nm dan HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Pada HPLC kolom yang digunakan adalah C-18 reverse phase dengan detektor UV-Visible pada panjang gelombang 280 nm. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 442 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat 8 Tual mampu menghasilkan IAA tertinggi yaitu 64 ppm. Aktivitas enzim protease tertinggi ditunjukkan oleh isolat TL7C dan TL5B sebesar 635 unit/mL dan 551,6 unit/mL pada waktu 36 jam

Kata kunci: Bakteri, Tual, Indole-3-acetic acid, protease

Abstract. Dewi TK, Suryanggono J, Agustiyani D. 2016. Isolation and activity test of IAA and protease producing bacteria from Tual Agricultural Land, Southeast Maluku. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 271-276. Indole-3-Acetic Acid producing bacteria may increase the growth and extension of the root and make the root surface becomes more widespread and eventually the plant is able to absorb more nutrients from the soil. Proteases producing bacteria has the ability to break down or eliminate the protein complexes in a polluted environment so that it can play a role in environmental bioremediation. The aim of this study was to isolation and activity test of growth hormone-producing bacteria and proteases producing bacteria from Ohoitel agricultural land, Tual, South East Maluku. Isolation and selection were done by total plate count method on the Tryptic Soy Broth and skim milk agar medium. IAA-producing bacteria activity test was done qualitatively and quantitatively. The method used was spectrophotometry at 530 nm and HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) with C-18 reverse phase column at 280 nm. Protease enzyme activity measurements were done by the spectrophotometric method at a wavelength of 442 nm. The results showed that isolates 8 Tual able to produce the highest IAA amount 64 ppm. The highest protease enzyme activity showed by TL7C and TL5B isolates amount 635 unit/mL and 551,6 units / mL at 36 hours.

Keywords: Bacteria, Tual, Indole-3-acetic acid, protease

PENDAHULUAN

Hormon tanaman merupakan sinyal kimia yang mempengaruhi kemampuan tanaman untuk beradaptasi terhadap lingkungannya. Hormon merupakan senyawa organik yang di sintesis pada salah satu bagian tanaman kemudian di transfer ke beberapa bagian yang lain.

Hormon ini berperan dalam pertumbuhan maupun pematangan buah (Saharan dan Nehra 2011). Auksin berperan sebagai hormon pemacu pertumbuhan tanaman, dan sering ditemukan di jaringan meristem. Dengan adanya bakteri endofit yang berkolonisasi atau bersimbiosis dalam jaringan tanaman, kebutuhan akan hormon tumbuh dapat disuplai oleh bakteri tersebut (Strobel dan Daisy 2003;

Spaepen et al. 2009). IAA (Indole-3-Acetic-Acid) merupakan hormon tumbuh yang memegang peranan penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Mikrobaa yang mampu menghasilkan IAA dapat meningkatkan pertumbuhan dan perpanjangan akar sehingga permukaan akar menjadi lebih luas dan akhirnya tanaman mampu menyerap nutrisi dari dalam tanah lebih banyak (Boloro et al. 2007). L-triptofan merupakan asam amino yang berfungsi sebagai precursor dalam biosintesis auxin (IAA) pada tanaman dan mikrobaa (Patil et al. 2011).

L-triptofan (L-TRP) sebagai prekursor fisiologis IAA, baik pada tanaman maupun pada mikroorganisme. Penambahan L-triptofan pada media kultur dapat meningkatkan produksi IAA. L-triptofan mengandung sumber senyawa aktif yang dapat memicu pertumbuhan mikrobiota rhizosfer dan endofit. Biosintesis mikrobiial IAA dalam tanah dapat dipicu dengan adanya L-triptofan yang berasal dari eksudat akar atau sel-sel yang rusak. Bakteri yang mampu memproduksi IAA akan menstimulasi pertumbuhan sistem perakaran inang. Bakteri penghasil hormon tumbuh IAA mensintesis hormon tersebut melalui jalur *tryptophan dependent pathway* dengan senyawa intermediet indolepyruvic acid (Patten dan Glick 2002; Husen 2003; Mohite 2013).

Protease merupakan enzim yang dapat memecah protein menjadi peptide dan asam amino. Protease umumnya di temukan pada tanaman, hewan maupun mikroorganisme. Pada bidang industri, produksi protease dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena dapat di hasilkan dalam jumlah besar. Protease yang berasal dari mikrobaa lebih banyak di gunakan di bandingkan enzim yang berasal dari tanaman maupun hewan (Kuma et al. 2012). *Bacillus*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, merupakan jenis mikroorganisme yang mampu menghasilkan protease (Patil et al. 2015). Bakteri dari genus *Bacillus* merupakan penghasil protease basa yang penting karena kemampuannya untuk menghasilkan enzim protease dalam jumlah besar, dengan aktivitas dan stabilitas pada pH dan suhu yang tinggi (Kumar dan Vats 2010). Produksi enzim protease dari mikroba tergantung pada tipe strain, komposisi medium, pertumbuhan sel, metode kultivasi, kebutuhan nutien, ion logam, pH, suhu, serta waktu inkubasi (Kumar et al. 2012).

Enzim protease yang berasal dari mikroba menduduki sekitar 60 % dari semua enzim protease yang beredar di pasaran (Rayda et al. 2012). Protease bisa bersifat asam, netral maupun basa tergantung dari aktivitasnya pada suhu yang berbeda (Narashima et al. 2011). Protease yang dihasilkan dari mikroorganisme memiliki banyak peran dalam industri yang berbeda (seperti deterjen, kulit, makanan dan industri tekstil) serta bioremediasi lingkungan. Protease memiliki kemampuan untuk menurunkan atau menghilangkan protein kompleks dari lingkungan tercemar (Vishwanatha et al. 2010). Dengan demikian, pencarian sumber enzim protease dari beberapa jenis mikroba telah lama di kembangkan.

Penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan uji aktivitas bakteri penghasil hormon tumbuh IAA dan perombak protein dari tanah pertanian kota Tual, Maluku Tenggara.

BAHAN DAN METODE

Area kajian

Sampel tanah

Sampel tanah dan akar di ambil dari beberapa lokasi pertanian di Ohoitel, Kota Tual, Maluku Tenggara. Sampel tanah dan akar yang di ambil berasal dari beberapa komoditas antara lain dari tanaman terong, kacang tanah, tomat lokal, jagung, buncis, dan singkong lokal. Sampel tanah dan akar yang di ambil di masukkan dalam polybag dan tabung dan di tutup rapat.

Bahan penelitian

Media yang di gunakan untuk produksi hormon tumbuh IAA adalah media TSB (*Tryptic Soy Broth*) dengan komposisi pepton 10 g, NaCl 2,5 g, agar 20 g dan akuades 1 l. Media yang di gunakan untuk pengurai protein adalah *skim milk agar* dengan komposisi adalah glukosa 1 g, yeast 2,5 g, susu skim 10 g, agar 20 g dan akuades 1 l. Medium Exoproteinase dengan komposisi pepton 5 g yeast extract 2,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0055 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,325 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,00625 g, Na_2SO_4 0,05 g, alkohol, reagen Salkowski, NaOH 2N, NaOH 1M, HCl 1N, Triptofan, Ethanol absolut, 0,5% Azocasein, Tris HCL mM, TCA 10%, reagen Bradford, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 525 mM NaOH.

Cara kerja

Isolasi bakteri penghasil IAA dan perombak protein

Sampel tanah ditimbang seberat 5 gram, dimasukkan ke dalam 45 mL aquades steril di dalam *Laminar Air Flow* dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 30 menit. Media yang digunakan untuk isolasi bakteri penghasil IAA adalah TSB dan metoda isolasi yang digunakan adalah plate count dengan pengenceran berseri. Koloni yang tumbuh pada media TSB dipindahkan untuk di lakukan pemurnian pada media TSB yang baru dan di lakukan uji kualitatif. Isolasi bakteri perombak protein menggunakan media *skim milk agar*, Isolat yang mampu merombak protein dengan menghasilkan enzim protease mampu menghasilkan zona bening. Isolat tersebut kemudian di murnikan dan di lakukan uji secara kuantitatif.

Analisis IAA secara kualitatif

Bakteri yang mampu menghasilkan IAA di uji secara kualitatif dengan metode kolorimetri menggunakan reagen *Salkowski* (Gordon dan Weber 1951). Pembuatan reagen *Salkowski* menurut Gordon dan Weber 1951 yaitu dengan mengambil 1 mL 0.5 M FeCl_3 di tambah 50 mL HClO_4 50% [v/v], selanjutnya disimpan dalam botol yang tidak tembus cahaya atau ditutup dengan aluminium foil. (FeCl_3 0.5M = 1.35 g / 10 mL) (HClO_4 50% = 25 mL HClO_4 + 25 mL Aquades). Isolat yang positif uji kualitatif kemudian dilanjutkan dengan analisis secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri dan HPLC. Konsentrasi IAA pada analisis dengan metode spektrofotometri berdasarkan nilai absorbansi yang diserap oleh spektrofotometer UV-Visible. Nilai absorbansi yang di hasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi sampel. Kurva standar di buat menggunakan

IAA murni. Panjang gelombang yang di gunakan adalah 530 nm berada pada daerah tampak. Panjang gelombang ini dipilih berdasarkan warna yang dihasilkan oleh interaksi antara reagen Salkowski dan IAA (Glickmann dan Dessaux 1995) yang menghasilkan warna merah muda.

Analisis IAA secara kuantitatif

Analisis kandungan IAA secara kuantitatif di lakukan dengan dua metode yaitu dengan metode spektrofotometri dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Analisis menggunakan metode spektrofotometri menurut Gravel et al. 2007 menggunakan 100 mL media *Tryptic Soy Broth* (TSB) 50 % (*half-strength*). Media yang telah steril tersebut ditambahkan precursor *L-Tryptophan* 200 ppm. Satu mL supernatan dari sampel hasil dari *sentrifuge* selama 10 menit pada 10.000 rpm, kemudian ditambahkan 2 mL larutan reagen *Salkowski*, diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit dan selanjutnya absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Konsentrasi IAA dari sampel di hitung berdasarkan kurva standar dengan standar IAA murni (Gravel et al. 2007). Analisis IAA dengan metode HPLC dilakukan dengan cara mengambil 5 mL sampel di sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan di ambil kemudian di atur pH nya menjadi 2,8. Selanjutnya di lakukan ekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan volume 1: 1 sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi yang di diperoleh kemudian dievaporasi dan di analisis dengan HPLC (Mehnaz dan Lazarovits 2006). Kolom yang di gunakan adalah LiChroCART 125-4 LiChrospher 100 C 18 RP-18e dan Fase gerak yang di gunakan adalah metanol: asam asetat: akuabides (30:1:70 v/v/v). Standar yang di gunakan adalah larutan IAA murni yang di ukur pada keadaan dan kondisi yang sama.

Produksi enzim protease oleh bakteri secara kuantitatif

Isolat terseleksi diinokulasikan pada medium exoproteinase kemudian diinkubasi selama 24 jam pada waterbath suhu 37°C selanjutnya di pindahkan pada medium exoproteinase yang baru dan diinkubasi selama 48 jam pada *shaker incubator*. Sampling di lakukan setiap 12 jam sekali dengan mengambil sebanyak 2 mL kultur cair , kemudian disentrifugasiin 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebagai ekstrak kasar. Analisis Pengukuran Kuantitatif Protease (Bergmeyer 1983) di lakukan dengan cara 100 µl ekstrak kasar dimasukkan ke dalam tabung *microtube* dan ditambahkan 100 µl 0,5% Azocasein dalam Tris HCl 100 mM pH 8. Inkubasi di waterbath pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian ditambahkan 400 µl TCA 100%. Sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan 700 µl 525 mM NaOH. Analisis kuantitatif protease secara spektrofotometri di ukur pada panjang gelombang 442 nm. Kadar protein di lakukan dengan metode Bradford 1976 yaitu 40 µl ekstrak kasar ditambah 2 mL reagen Bradford. Selanjutnya di inkubasi selama 10 menit dan kadar protein di ukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

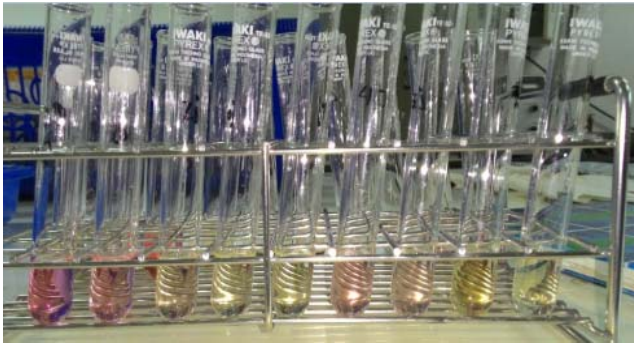
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel tanah yang digunakan yaitu sampel tanah dan akar dari tanaman terong, kacang tanah, jagung, tomat, buncis dan akar singkong lokal (enbal) dari pertanian Ohoitel, Kota Tual, Maluku Tenggara. Hasil isolasi menunjukkan beberapa isolate secara kualitatif mampu menghasilkan IAA dan merombak protein. Gambar 1 menunjukkan hasil pengujian produksi IAA oleh isolat bakteri. Bakteri yang mampu menghasilkan IAA akan menghasilkan warna merah muda ketika di tetesi dengan reagen Salkowski. Isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif menghasilkan IAA secara kualitatif yaitu TL7B, TL2, TL5C, TL4CB, TL1C, TL4CA, IC, TL5B, dan 8 Tual.

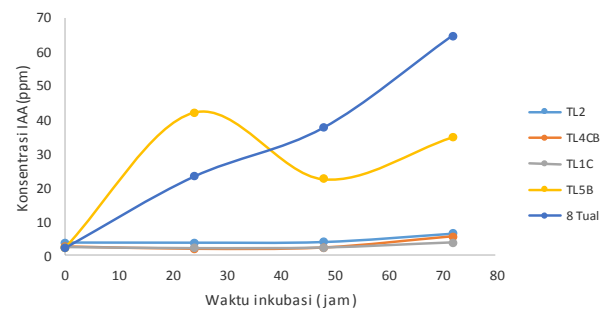
Isolat yang mampu menghasilkan IAA secara kualitatif akan berwarna merah muda karena adanya interaksi antara IAA dengan Fe membentuk senyawa kompleks $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{IA})_4]$, IA merupakan indole-3-acetate. Interaksi tersebut terjadi pada suasana asam (Kovacs 2009). Menurut Kovacs (2009) reaksi yang terbentuk ada dua macam yaitu reaksi kompleks dan reaksi redoks. Warna merah muda yang semakin pekat menunjukkan kandungan IAA yang di hasilkan oleh bakteri semakin tinggi. Hasil analisis menggunakan spektrofotometri menunjukkan bahwa isolate 8 Tual mampu menghasilkan IAA tertinggi yaitu 79 ppm pada waktu 72 jam. Pada jam ke-72 Isolat 8 Tual memasuki fase awal stasioner, pada fase ini nutrient pada media mulai berkurang sehingga akan di hasilkan metabolite sekunder IAA yang relative tinggi. Hal ini sesuai dengan Wahyudi et al. (2011) yang menyebutkan bahwa kadar hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri melimpah pada saat fase stasioner. Produksi IAA akan meningkat pada saat kondisi pertumbuhan menurun, ketersediaan karbon yang terbatas dan terjadi dalam kondisi lingkungan dengan pH asam (Ona et al. 2005). Kondisi tersebut menunjukkan keterkaitan antara produksi IAA dengan pertumbuhan bakteri yang memasuki fase stasioner.

Produksi IAA oleh isolate biasanya terjadi pada awal fase stasioner demikian juga pada isolate 8 Tual, IAA yang terbentuk maksimum terjadi pada awal fase stasioner (jam ke-72). Nilai *optical density* (OD) paling tinggi di tunjukkan oleh isolat TL2, akan tetapi IAA yang di hasilkan kecil. Lima isolat unggulan hasil seleksi yang mampu menghasilkan IAA tertinggi dari analisis spektrofotometri yaitu Isolat TL2, TL4CB, TL1C, TL5B dan 8 Tual selanjutnya di analisis menggunakan metode HPLC. Analisis IAA secara kuantitatif dengan HPLC menunjukkan bahwa isolat yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA memiliki puncak kromatogram yang sama dengan puncak kromatogram pada standar IAA seperti pada Gambar 3 dan Gambar 4. Hasil pengukuran konsentrasi IAA menggunakan metode HPLC ditunjukkan pada Gambar 5.

Hasil analisis menunjukkan bahwa isolate 8 Tual mampu menghasilkan IAA tertinggi yaitu 64,8 ppm. Hasil tersebut sedikit berbeda dengan hasil analisis menggunakan spektrofotometri. Konsentrasi IAA yang di analisis menggunakan HPLC lebih kecil. Analisis menggunakan HPLC lebih sensitif di bandingkan dengan spektrofotometer.



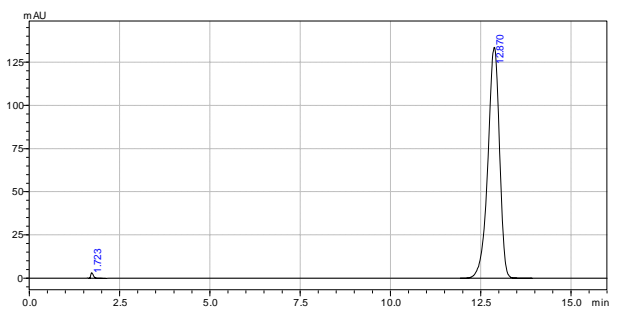
Gambar 1. Sampel untuk analisis dengan spektrofotometer dengan penambahan reagen *Salkowski*



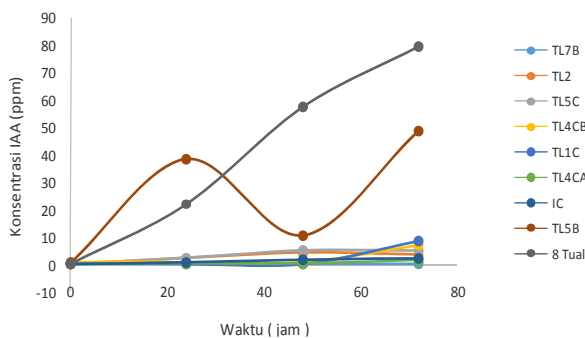
Gambar 5. Hasil analisis kandungan IAA dengan metode HPLC



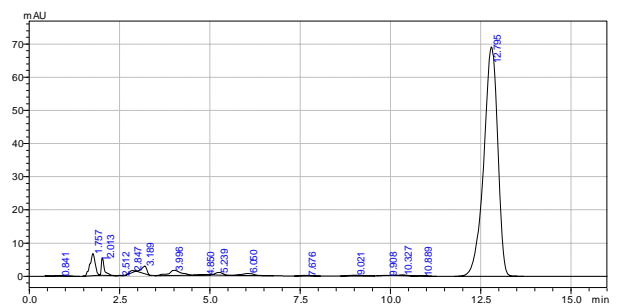
Gambar 2. Bakteri yang mampu menghasilkan IAA berwarna merah muda setelah di tetesi reagen *Salkowski* (kanan), sebelum di tetesi *Salkowski* (kiri)



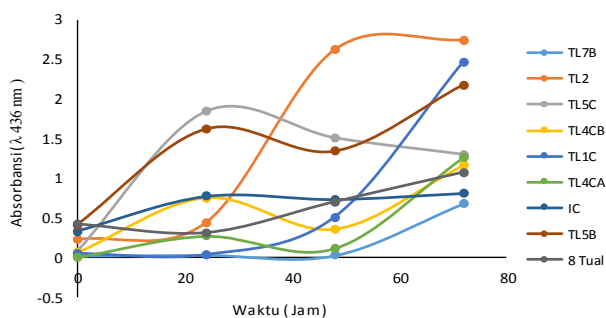
Gambar 6. Kromatogram standar IAA



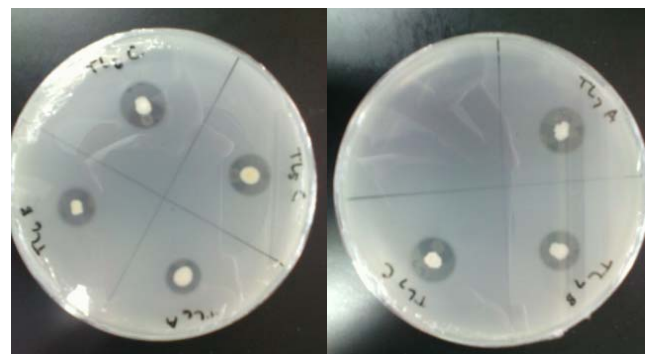
Gambar 3. Hasil analisis kandungan IAA dengan metode spektrofotometri



Gambar 7. Kromatogram isolate 8 Tual yang mampu menghasilkan IAA



Gambar 4. Kurva pertumbuhan isolat pada media TSB



Gambar 8. Zona bening yang di hasilkan oleh beberapa isolate pada medium *skim milk agar*

Analisis IAA menggunakan HPLC pada isolat 8 Tual menunjukkan bahwa terdapat puncak kromatogram dengan waktu retensi 12,796 menit, puncak kromatogram tersebut merupakan puncak kromatogram dari IAA. Waktu retensi puncak kromatogram tersebut di bandingkan dengan waktu retensi IAA standar. Berdasarkan kurva standar yang terbentuk, konsentrasi IAA yang dihasilkan sampel 8 Tual yakni 64,8 ppm. Hormon IAA disintesis sebagai metabolit sekunder yang dihasilkan dalam kondisi pertumbuhan bakteri suboptimal atau saat tersedia prekursor asam amino triptofan. Biosintesis IAA oleh bakteri, dapat ditingkatkan dengan penambahan L-triptofan sebagai prekursor ke dalam medium tumbuh bakteri (Silitonga et al. 2012).

Analisis aktivitas enzim protease bakteri secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada medium *skim milk agar* dan dihitung zona bening yang dihasilkan. Medium tersebut mengandung protein berupa kasein, yaitu protein susu yang tidak bersifat permeabel terhadap sistem transportasi sel mikroorganisme. Oleh karena itu, mikroorganisme menghasilkan protease ekstraseluler agar dapat menghidrolisis kasein menjadi asam amino, mentransportasikannya masuk ke dalam sel, dan menggunakannya di dalam sel (Harley dan Prescott 2002).

Zona bening yang terbentuk pada medium mengindikasikan terjadinya reaksi hidrolitik kasein oleh protease ekstraseluler. Sebaliknya, ketiadaan zona bening pada medium mengindikasikan tidak terjadinya reaksi hidrolitik kasein oleh protease ekstraseluler (Harley dan Prescott 2002). Selain itu, tidak terbentuknya zona bening juga mungkin disebabkan enzim protease yang dihasilkan oleh isolat kurang spesifik terhadap substrat *skim milk*. Isolat yang menunjukkan adanya aktivitas protease tertinggi yakni isolat TL7C, TL2C, TL4F, TL5B, TL6B, TL7A, dan TL7B.

Hasil dari uji kualitatif aktivitas enzim protease bakteri menunjukkan isolat TL7C menghasilkan diameter zona jernih tertinggi dibandingkan dengan isolat lain yakni 2,5 cm. Besarnya aktivitas enzim protease isolat TL7C juga ditunjukkan dari uji kuantitatif total aktivitas protease bakteri yang menunjukkan isolat TL7C dan TL5B memiliki aktivitas enzim protease tertinggi dibandingkan dengan isolat lain. Aktivitas enzim protease isolat TL7C yaitu 635 unit/mL pada waktu 36 jam sedangkan TL5B adalah 551,6 unit/mL. Aktivitas enzim protease maksimum di perkirakan terjadi pada fase stationer.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolate-isolat yang berasal dari tanah pertanian di Ohoitel, kota Tual, Maluku Tenggara memiliki aktivitas sebagai penghasil hormon tumbuh dan perombak protein dengan nilai aktivitas yang relative tinggi jika di bandingkan dengan penelitian yang telah di lakukan oleh Oktavia (2014) di mana isolate yang berasal dari daerah Lampung mampu aktivitas protease sebesar 134,667 unit/mL, sedangkan dalam penelitian ini aktivitas protease yang di hasilkan sebesar 635 unit/mL.

Dalam kesimpulan, isolat-isolat yang berasal dari Ohoitel, Tual, Maluku Tenggara mampu menghasilkan hormone tumbuh IAA dan merombak protein. IAA tertinggi di hasilkan oleh isolate 8 Tual dengan konsentrasi IAA sebesar 64,8 ppm. Aktivitas protease tertinggi di hasilkan oleh TL7C yaitu sebesar 635 unit/mL.

Tabel 1. Diameter zona bening hasil uji aktivitas enzim protease bakteri

Isolat	Hari ke 1 (cm)	Hari ke 2 (cm)	Hari ke 3 (cm)
TL2C	0,8	1,4	1,7
TL4F	0,7	1,3	1,7
TL5B	0,6	1,3	1,7
TL6B	0,7	1,4	1,8
TL7A	0,9	1,5	1,7
TL7B	0,6	1,4	1,7
TL7C	0,9	1,9	2,5

Tabel 2. Hasil uji kuantitatif aktivitas protease bakteri

Isolat	Aktivitas Protease (Unit/ML)				
	0 JAM	12 JAM	24 JAM	36 JAM	48 JAM
TL2C	8,3	6,1	-6,8	16,4	-19,2
TL4F	-0,1	215,3	6,2	2,3	13,5
TL5B	11,4	138,9	210,8	551,6	520,1
TL6B	40	31,5	7,6	43,8	31
TL7A	5,5	109,6	384,9	296,3	87,4
TL7B	3,8	0	25,3	51,6	25,4
TL7C	6,8	116,6	575,1	635	365,8

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada team teknis dan laboran (Entis Sutisna, Nani Mulyani, Astri Anggraeni, Ari Rosmalina) Laboratorium Mikrobiologi Pertanian, Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Penelitian ini dapat terlaksana dengan pendanaan dari Program Tekno Park Tual, Maluku Tenggara, Puslit Oseanografi LIPI Tahun 2015 dan DIPA Pusat Penelitian Biologi Tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Bergmeyer HU. 1983. Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed, vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim.
- Bolero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassan F, Luna V. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. Appl Microbiol Biotechnol 74: 874-880.
- Glickman E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Slakowsky reagent for indolic compounds produces by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 1: 793-799
- Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol 26: 192-195.
- Gravel V, Antoun H, Tweddel RJ. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biol Biochem 39: 1968-1977.
- Harley JP, Prescott LM. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. 5th ed. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Husen E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. J Agric 4 (1): 27-31.
- Kovacs K. 2009. Applications of Mossbauer Spectroscopy in Plant Physiology [Ph.D. Dissertation]. ELTE Chemistry Doctoral School, ELTE Institute of Chemistry, Budapest.
- Kumar R, Vats R. 2010. Protease production by *Bacillus subtilis* immobilized on different matrices. New York Sci J 3 (7): 20-24.
- Mehnaz S, Lazarovits G. 2007. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum*

- on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51: 326-335.
- Mohite B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr* 13 (3): 638-649.
- Mukesh Kumar DJ, Pramavathi V, Govindarajan N, Balakumaran MD, Kalaichelvan PT. 2012. Production and purification of alkaline protease from *Bacillus* sp. MPTK 712 isolated from dairy sludge. *Global Veterinaria* 8 (5): 433-439.
- Oktavia D. 2014. Karakterisasi Aktivitas Protease Kasar Dari Isolat Aktinomisetes CIIA5b-DW Dan L88b-DW. [Skripsi]. Universitas Indonesia, Depok.
- Ona O, van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden D. 2005. Growth and indole-3-acetic-acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett* 246: 125-132.
- Patil NB, Gajbhiye M, Ahiwale SS, Gunjal AB, Kapadnis BP. 2011. Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. *Intl J Environ Sci* 2 (1): 307-314.
- Patil P, Sabale S, Devale A. 2015. Isolation and characterization of protease producing bacteria from rhizosphere soil and optimization of protease production parameters. *Intl J Curr Microbiol App Sci* (2015) Special Issue 2: 58-64.
- Patten CL, Glick BR. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indole-3-acetic acid in development of the host plant root system. *J Appl Environ Microbiol* 68 (8): 3795-3801.
- Rayda S, Fakher F, Samiha M, Moncef N, Alya SK. 2012. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* II on shrimp peptone using statistical experimental design. *Sci World J* (2002): 1-11.
- Saharan BS, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res* 21: 1-30.
- Silitonga DM, Priyani N, Nurwahyuni I. 2012. Isolasi dan uji potensi isolat bakteri pelarut fosfat dan bakteri penghasil hormon IAA (Indole Acetic Acid) terhadap pertumbuhan kedelai (*Glycine max* L.) pada tanah kuning. *Saintia Biologi* 1 (2): 35-41.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv Botl Res* 51: 283-320.
- Strobel G, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 491-502.
- Vishwanatha T, Spoorthi-Jain N, Reena V, Divyashree BC, Siddalingeshwara KG, Karthic J, Sudipta KM. 2010. Screening of substrates for protease production from *Bacillus licheniformis*. *Intl J Engin Sci Technol* 2 (11): 6550-6554.
- Wahyudi AT, Astuti RP, Widyawati A, Meryandini A, Nawangsih AA. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strain isolated from rizhospere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *J Microbiol Antimicrob* 3 (2): 34-40.