



DETEKSI SIDEROFOR YANG DIHASILKAN OLEH RIZOBAKTERI DENGAN MENGUNAKAN ELISA MICROPLATE READER

¹ Qomariyah

Laboratorium Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Denpasar, Indonesia
qomariyah@unud.ac.id

²Ni Kadek Desy Andya Dewi

Laboratorium Biopestisida, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Denpasar, Indonesia
desyandya@unud.ac.id

Abstract Rizobakteri atau bakteri yang berada pada sekitar perakaran tanaman mulai banyak dikembangkan sebagai upaya peningkatan kualitas pangan dan kelestarian lingkungan. Rizobakteri dapat memacu pertumbuhan dengan cara menghasilkan hormon IAA, memfikasi N, melarutkan P, mengendalikan penyakit tanaman dan produksi siderofor. Mekanisme dari rizobakteri dalam mengendalikan penyakit tanaman salah satunya dengan persaingan pemanfaatan Fe melalui produksi senyawa siderofor. Siderofor merupakan senyawa yang berperan sebagai antimikroba yang dapat mengikat besi yang tinggi, cepat menyeras dan cepat larut dalam air. Siderofor dapat melarutkan fosfor yang dibutuhkan tanaman dengan baik sehingga tumbuhan dapat tahan terhadap penyakit. Deteksi siderofor yang dihasilkan oleh rizobakteri dapat menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 410 nm dan dengan *microplate reader* dengan panjang gelombang 630 nm. *Microplate reader* memiliki prinsip yang mirip dengan spektrofotometer begitupula ELISA Microplate Reader. ELISA Microplate Reader memiliki fasilitas pembacaan panjang gelombang pada 630nm. Sehingga dapat digunakan untuk mengukur kadar siderofor yang dihasilkan oleh Rizobakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah mendeteksi kandungan Siderofor yang dihasilkan oleh rizobakteri dengan ELISA Microplate Reader. Isolate rizobakteri TbKr9, SrDp3, RgDp1, RgTb23, AITb27 dan JgKr8 dapat memproduksi siderofor. Isolat JgKr8 memproduksi siderofor yang paling tinggi dengan konsentrasi 462,03 PSU dibandingkan dengan isolat lainnya.

Kata Kunci : Siderofor, Rizobakteri, ELISA Microplate Reader.

I. PENDAHULUAN

Rizobakteri adalah bakteri yang berada pada sekitar perakaran tanaman. Rizobakteri saat ini mulai banyak dikembangkan untuk meningkatkan kualitas pangan dan menjaga kelestarian lingkungan. Penggunaan Rizobakteri untuk pengurangan penggunaan pupuk kimia buatan maupun pestisida kimia buatan. Rizobakteri dalam memacu pertumbuhan dengan cara menghasilkan hormon IAA, memfiksasi N, melarutkan P, mengendalikan penyakit tanaman dan produksi siderofor (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009).

Cara rizobakteri dalam mengendalikan penyakit atau patogen pada tanaman dengan cara memproduksi senyawa antibiotik, kompetisi nutrisi, memproduksi siderofor, menginduksi ketahanan sistemik tanaman, mencegah perkecambahan patogen, pengukuran senyawa yang bersifat racun. (Van Loon, 2007).

Siderofor merupakan bahan aktif antimikroba yang memiliki sifat pengikat besi sangat tinggi dalam mengendalikan penyakit tanaman, memiliki sifat cepat menyebar dan memiliki sifat yang larut dalam air. Adanya senyawa siderofor dapat melepaskan fosfor yang dibutuhkan tanaman, sehingga tanaman dapat tumbuh dengan lebih baik dan tahan terhadap penyakit. (Habazar & Yaharwandi, 2006).

Deteksi siderofor yang dihasilkan oleh rizobakteri dapat diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer pada Panjang gelombang tertentu. Menurut Dirmawati tahun 2003 deteksi siderofor dapat di analisis dengan menggunakan spektrofotometer model Novaspec II pada panjang gelombang 410 nm. Menurut Maulina tahun 2021, kadar siderofor di deteksi dengan *microplate reader* pada Panjang gelombang 630 nm. *Microplate reader* memiliki prinsip yang mirip dengan spektrofotometer begitupula ELISA Microplate Reader. ELISA Microplate Reader memiliki fasilitas pembacaan panjang gelombang pada 630nm. Sehingga dapat digunakan untuk mengukur kadar siderofor yang dihasilkan oleh Rizobakteri.

II. METODE DAN PROSEDUR

A. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan mei 2023 di Laboratorium Biopestisida, Fakultas Pertanian Universitas Udayana, Kampus Sudirman, Denpasar.

B. Analisis Rizobakteri dalam menghasilkan Siderofor

Produksi siderofor dianalisis menggunakan media agar Chrome Azurol Sulfate (CAS) (Khambani *et al.* 2019). Media CAS terdiri dari 60,5 mg CAS dilarutkan dalam 50 ml air suling kemudian dicampur dengan 10 ml larutan besi (1 mmol/liter $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM/L HCl sambil dishaker. Larutan ini ditambahkan secara perlahan 72 mg HDTMA yang dilarutkan dalam 40 ml air. Tambahkan Agar 15gram dalam 1 liter CAS. Isolat rizobakteri diinokulasikan ke media CAS pada cawan Petri dengan jarum ose, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Koloni Bakteri yang dapat menghasilkan siderofor akan berwarna kuning sampai oranye yang kontras dengan warna biru-hijau pada media CAS (Prihatiningsih *et al.*, 2017).

Kadar siderofor diukur dengan cara 10 μl suspense bakteri (10⁸ CFU/ml) ditumbuhkan pada media LB Broth. Kultur ini diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C. Kemudian disentrifuge pada 10.000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 100 μl supernatant diambil dan dimasukkan ke dalam microplate well dan ditambahkan 100 μl CAS. Inkubasi dilakukan selama 30 menit pada tempat gelap dan suhu ruang. Kemudian di analisis pada ELISA Reader RT2100C dengan Panjang gelombang 630 nm.

Absorbansi kemudian dibaca dengan rumus:

Produksi Siderofor (psu= present siderofor unit) = $(A_r - A_s) \times 100 A_r$

Keterangan: A_r = absorbansi control A_s = absorbansi sampel

E. Analisa Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis of varians (ANOVA) dengan Rancangan Acak Lengkap yang dilanjutkan dengan uji Duncans Multiple Range Test (DMRT). Analisis statistik dilakukan dengan program software SPSS for windows version 17.0 tahun 2009.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi siderofor dideteksi menggunakan media agar Chrome Azurol Sulfate (CAS). Produksi siderofor diketahui dengan melihat warna koloni dan media di sekitar koloni yaitu berwarna oranye atau kuning pada Petri dengan media CAS yang semula berwarna hijau tua (Gambar 1).



Gambar 1

Perbandingan antara isolat yang menunjukkan kemampuan menghasilkan siderofor, A: interpretasi positif (+); B: interpretasi negatif (-)

Rizobakteri penghasil siderofor didapatkan sebanyak 18 isolat, dari 31 isolat yang diujikan, seperti disajikan pada Tabel 5.2. Uji bakteri penghasil siderofor juga dilakukan oleh Srimathi dan Suji (2018), yang mendapatkan isolat bakteri dari sampel air laut di perairan pantai kemudian menguji kemampuannya menghasilkan siderofor dengan menggunakan media CAS. Zona oranye yang didapatkan di sekitar koloni mengindikasikan bahwa bakteri tersebut menghasilkan siderofor. Menurut Louden, et al. (2011), media CAS akan membentuk kompleks yang kuat dengan Fe yang menyebabkan warna biru. Pada saat bakteri mengalami cekaman kekurangan Fe, bakteri akan mampu memproduksi siderofor sebagai agen pengkelat Fe^{3+} (Verma et al., 2012). Isolat rizobakteri yang di uji berjumlah 94 dan sebanyak 6 isolat rizobakteri yang menghasilkan siderofor yang tinggi seperti pada tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji siderofor terhadap isolate rizobakteria.

No	Lokasi	Tanaman	Isolat	Siderofor
1	Tabanan	Alang-alang	AlTb27	+++
2	Karangasem	Jagung	JgKr8	+++
4	Denpasar	Rumput gajah	RgDp1	+++
5	Tabanan	Rumput gajah	RgTb23	+++
6	Denpasar	Serai	SrDp3	++
7	Karangasem	Tebu	TbKr9	+++

Hasil tersebut juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rana, et al. (2011) yang meneliti gandum dan menguji bakteri penghasil siderofor. Hanya isolate AW5 yang positif menghasilkan siderofor, yang menunjukkan warna kuning pada media CAS. Penghitungan konsentrasi siderofor dilakukan dengan menggunakan uji spektrofotometri, dengan panjang gelombang 630 nm. Berdasarkan data pada Tabel 2. konsentrasi siderofor tertinggi adalah dari isolat JgKr8 yaitu sebesar 462,03 PSU, dan yang paling rendah adalah RgTb23 yaitu 166,26 PSU.

Tabel 2 Konsentrasi siderofor yang dihasilkan oleh isolate rizobakteri yang tertinggi

Isolat Bakteri	Konsetrasi Siderofor (PSU)
TbKr9	205,83
SrDp3	382,53
RgDp1	233,19
RgTb23	166,26
AlTb27	237,46
JgKr8	462,03

VI. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat rizobakteri dari tanaman Gramineae yang mampu menghasilkan siderofor dan dapat di analisis secara kuantitatif dengan ELISA Reader RT2100C pada panjang gelombang 630 nm. Isolate rizobakteri TbKr9, SrDp3, RgDp1, RgTb23, AlTb27 dan JgKr8 dapat memproduksi siderofor. Isolat JgKr8 memproduksi siderofor yang paling tinggi dengan konsentrasi 462,03 PSU dibandingkan dengan isolat lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada LPPM Universitas Udayana telah memberikan dukungan dana dengan program DIPA PNBPU Universitas Udayana TA-2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Advinda L. 2009. Tanggap Fisiologis Tanaman Pisang yang Diintroduksi dengan Formula Pseudomonad Fluoresen Terhadap Blood Disease Bacteria (BDB). Disertasi. Program Pascasarjana. Padang: Universitas Andalas.
- Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque MA, Islam MZ, Shahidullah SM, & Meon S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African J. Biotechnol.* 8:1247-1252.
- Budzikiewicz, H. 1997. Siderophores of Fluorescent Pseudomonads. *Z. Naturforsch.* 52: 713-720.
- Dudeja, S.S., Sunita, S., and Al, K. 1997. Iron Acquisition System and its Role in Legume-Rhizobium Symbiosis. *Indian J Microbiol*, 37(1): 1-12.
- Glick BR & Pasternak JJ. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles dan Applications of Recombinant DNA*. Ed ke-3. Washington: ASM Press.
- Habazar T & Yaherwandi. 2006. *Pengendalian Hayati Hama dan Penyakit Tumbuhan*. Padang: Andalas University Press.
- Herman MAB, Nault BA, & Smart CD. 2008. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infesta
- Khambani, L.S., Ahmed, I.A., and Thierry, R. 2019. Rhizospheric Bacteria from Pristine Grassland Have Beneficial Traits for Plant Growth Promotion in Maize (*Zea mays L.*). *Cogent Biology*, 5(1): 1-14.

- Kumar, P. , Sachin, T., Dhingra, G.K., Abha, S., Manoj, K.P., Kumar, H., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. 2018. Inoculation of Siderophore Producing Rhizobacteria and Their Consortium for Growth Enhancement of Wheat Plant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15: 264–269.
- Minorsky PV. 2008. Pyrroloquinoline Quinone: A New Plant Growth Promotion Factor. *Plant Physiol.* 146: 323–324.
- Prihatiningsih, N., Djatmiko, H.A., dan Lestari, P. 2017. Aktivitas Siderofor *Bacillus subtilis* sebagai Pemacu Pertumbuhan dan Pengendali Patogen Tanaman Terung. *Jurnal HPT Tropika*, 17(2): 170-178.
- Prihatiningsih, N., Djatmiko, H.A., dan Lestari, P. 2020. “Mekanisme Bakteri Endofit Akar Padi sebagai Pengendali Patogen Hawar Daun Bakteri Padi”. *Prosiding Seminar Nasional dan Call for Papers ”Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan X”*. 6-7 Oktober 2020 Purwokerto ISBN 978-602-1643-65-5
- Radzki, W., F. J. G. Manero, E. Algar, J. A. Lucas Garcí a, A. Garcí a-Villaraco, B. R. Solano. 2013. Bacterial Siderophores Efficiently Provide Iron to Iron- Starved Tomato Plants in Hydroponics Culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104:321–330.
- Rashid,M.I., Liyakat, H.M., Tanvir, S., Talal, A., Iqbal, M.I.I., and Mohammad, O. 2016. Bacteria and Fungi Can Contribute to Nutrients Bioavailability and Aggregate fFrmation.
- Sahu, G.K. and Shindu, S.S. 2011. Disease Control and Plant Growth Promotion of Green Gram by Siderophore Producing *Pseudomonas* sp. *Research Journal of Microbiology*, 6(10): 735-749.
- Sheirdil, R.A., Rifat, A., Xiao-X. Z., Nadeem, A.A., Safdar, A., Mukhtar, A., Jabar, Z.K.K., Shakeel, A. 2019. Exploring Potential Soil Bacteria for Sustainable Wheat (*Triticum aestivum* L.) Production. *Sustainability*, 11(12): 1-12.
- Weller DM. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2): 250-256.