

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kadmium (Cd) adalah logam dengan toksisitas tinggi. Kadmium tidak dapat terdegradasi secara alami, apabila terbebas di lingkungan maka kadmium tersebut tetap disirkulasi. Masuknya kadmium ke tubuh manusia dapat menyebabkan gagal ginjal, kanker paru-paru dan kanker prostat. Mamalia dapat mentoleransi kadmium pada konsentrasi rendah dengan adanya suatu protein yang mengubahnya menjadi tidak berbahaya dalam tubuh. Namun menyebabkan terjadinya akumulasi pada ginjal dan hati. Pada organisme perairan, adanya kadmium dapat menyebabkan terganggunya metabolisme kalsium hingga kematian larva (WHO, 2003).

Kadmium banyak digunakan sebagai stabilizer dalam pembuatan polivinil klorida dan zat warna dalam industri baterai. Selain itu kadmium juga banyak digunakan dalam industri-industri ringan, seperti mesin pengolahan roti, mesin pengolahan ikan, mesin pengolahan air minum dan mesin industri tekstil meskipun dalam konsentrasi rendah (Pallar, 1994). Menurut laporan WHO (2003), penggunaan kadmium terbesar adalah pada industri baterai yaitu mencapai 73% atau 1.900 ton/tahun. Menurut Wardhani dkk., (2016) terjadi pencemaran kadmium di sedimen Waduk Sanguling, Jawa Barat sekitar 18,64-23,25 mg/kg akibat dari pembuangan baterai/aki, PVC dan pelapisan, dimana konsentrasi tersebut melebihi baku mutu. Menurut Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001, baku mutu kualitas air yaitu 0,01 mg/l.

Pencemaran kadmium pada lahan pertanian di Indonesia telah melebihi ambang batas sehingga memerlukan perhatian yang serius baik oleh pelaku industri, pemerintah dan petani. Adanya logam kadmium dapat ditemukan dalam pupuk fosfat dan pupuk kandang. Pupuk fosfat memiliki kandungan kadmium sebesar 30-60 mg/kg. Sebenarnya untuk tanah sendiri memiliki kandungan kadmium secara alami pada konsentrasi 0,1 – 1 mg/kg. Tanah dapat dikatakan terkena kontaminasi kadmium sebesar 3-10 mg/kg (Kuntyastuti dan Sutrisno, 2015). Tanaman yang menyerap kadmium terlalu banyak menyebabkan klorosis, daun menggulung dan kekurangan gizi. Tanaman hiperakumulator dapat tumbuh dengan baik pada kondisi tanah yang tercemar logam dengan konsentrasi tinggi namun tidak menunjukkan gejala kerusakan (Rascio dan Navari-Izzo, 2011)

Tanaman biduri termasuk tumbuhan sebagai fitoremediator pada logam kadmium yang lebih baik daripada rumput gajah karena lebih beradaptasi dilihat dari tidak adanya gejala keracunan (Hapsari dan Lestari, 2017). Tanaman biduri memiliki kemampuan adaptasi *xerophytic* serta memiliki kelebihan berkembang biak dengan cepat melalui penyerapan zat-zat oleh akar sehingga bagian tanaman yang di atas tanah dapat berkembang biak lagi tanpa perlu pembijian (D'Souza dkk., 2010)

Sistem akar pada tumbuhan fitoremediator merupakan sasaran utama pada kontaminan logam. Logam akan diserap pada akar dan akan mengeluarkan zat organik dan anorganik berupa eksudat di *rhizosphere*. Eksudat akar ini penting mempengaruhi jumlah dan aktivitas mikroorganisme, agregasi dan menstabilisasi partikel tanah. Aktivitas mikroorganisme dapat meningkatkan evapotranspirasi,

penyerapan pada akar serta mengurangi kontaminasi logam pada tanah ke tanaman (Boroş dkk., 2014)

Hubungan antara tanaman dan mikroba yang ada di *rhizosphere* berperan dalam meningkatkan efisiensi fitoremediasi melalui proses yang dinamakan '*bio-assisted phytoremediation*'. Mikroorganisme yang di daerah sekitar akar disebut *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) yang memiliki berbagai mekanisme untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman dan meminimalkan stres pada tanaman yang terkena cekaman lingkungan. PGPR membantu fitoremediasi secara langsung maupun tidak langsung melalui beberapa mekanisme seperti meningkatkan penyerapan nutrisi, menekan patogen dengan memproduksi antibiotik dan siderofor atau zat antagonis bakteri dan jamur (hidrogen sianida, HCN), produksi fitohormon (asam indoleacetic, IAA) dan fiksasi nitrogen (Verma dkk., 2017) Bakteri PGPR merupakan bakteri yang menguntungkan yang mengolonisasi akar tanaman dan meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan mekanisme yang bervariasi. Bakteri PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) merupakan bakteri yang memproduksi eksopolisakarida dalam kondisi yang tidak menguntungkan. Eksopolisakarida adalah komponen struktural dari matriks ekstraseluler pada biofilm yang disintesis oleh sel sebagai respon cekaman fisiologis.(Putrie, 2016).

Pada penelitian Wu dkk. (2009) bakteri yang menghasilkan eksopolisakarida salah satunya adalah *A. chroococcum* dan memiliki tingkat ketahanan serta pengikatan logam Pb dan Cd. Pada penelitian Hindersah (2010), *Azotobacter sp.* LKM6 tahan terhadap konsentrasi Cd tinggi dan mampu

memproduksi eksopolisakarida di bawah cekaman CdCl_2 . Inokulan *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas* sp. yang merupakan bakteri yang berpotensi PGPR ini biasanya dapat dimanfaatkan sebagai *biofertilizer* (Putrie, 2016).

B. Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) sebagai fitoremediator telah dilakukan oleh Lazar (2015) yang bertujuan untuk mengetahui potensi tanaman biduri dalam meremediasi tanah yang tercemar logam berat kadmium dan mengetahui pengaruh logam berat kadmium terhadap pertumbuhan tanaman biduri. Perlakuan konsentrasi kadmium yang diberikan adalah 0, 250, 500 dan 750 ppm. Hasil menunjukkan bahwa pada kadmium konsentrasi 250 ppm tanaman biduri dapat menyerap logam tersebut 8,351 ppm; pada konsentrasi 500 ppm tanaman biduri dapat menyerap 33,436 ppm; sedangkan 750 ppm dapat menyerap 37,325 ppm dari logam kadmium.

Penelitian mengenai bakteri *Plant Growth for Promoting Rhizobacteria* dilakukan oleh Wahyudi dkk. (2011) yang bertujuan melihat bakteri yang berpotensi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* pada Tanaman Kedelai. Dalam penelitian tersebut ditemukan sekitar 118 isolat *Bacillus* sp dengan 90 isolat (76,3%) positif memproduksi IAA, 12 isolat dapat menginisiasi perkecambahan, pemanjangan akar, dan memacu pertumbuhan tunas. Sebanyak 12 isolat mampu mengasilkan siderofor dan 11 mampu melarutkan fosfat.

Penelitian lainnya mengenai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* oleh Belimov dkk. (2005) yang bertujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri tahan kadmium yang terdapat pada tanaman Sawi India

yang ditumbuhkan pada tanah yang terkontaminasi logam berat dan memilih bakteri PGPR yang berguna untuk meningkatkan biomassa tanaman pada kondisi lingkungan tidak menguntungkan. Hasil yang didapatkan adalah terdapat bakteri *Variovorax paradoxus*, *Rhodococcus* sp., dan *Flavobacterium* sp.

Penelitian Agrawal dkk. (2012) menunjukkan bahwa semua strain *Pseudomonas* sp. ditemukan hingga konsentrasi 500 ppm pada kadmium. Permukaan sel *Pseudomonas* sp. bermuatan negatif karena adanya struktur bersifat anionik. Hal tersebut menunjukkan bakteri memiliki kemampuan untuk mengikat logam kation yang kemudian terjadi pemindahan logam langsung dari tanah yang tercemar atau kemungkinan perpindahan logam yang terakumulasi dari tumbuhan yang lebih tinggi.

Pada penelitian Zhou dkk. (2017) yang termasuk bakteri PGPR dapat meningkatkan resistensi kadmium dengan auksin endogen pada tanaman *Arabidopsis* lalu mengaktifkan mekanisme fiksasi kadmium di dinding sel akar dan penyerapan Fe. *Bacillus amyloliquefaciens* SAY09 meningkatkan mobilisasi dinding sel penyerapan Fe dan peningkatan kadar Fe terlarut di bawah tekanan kadmium, sehingga memungkinkan lebih banyak polisakarida dinding sel untuk mengikat kadmium. Efek yang nampak adalah memperbaiki klorosis pada daun (Zhou dkk., 2017)

C. Rumusan Masalah

1. Isolat bakteri apa yang terdapat pada akar Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) yang tahan terhadap logam kadmium?

2. Apakah isolat bakteri yang ditemukan memiliki potensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ?

D. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui isolat bakteri yang tahan kadmium yang terdapat pada rhizosfer tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)
2. Mengetahui isolat bakteri yang ditemukan memiliki potensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*.

E. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna bagi masyarakat
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memanfaatkan isolat bakteri PGPR untuk meningkatkan biomassa tanaman pada kondisi cekaman, mengoptimalkan remediasi logam kadmium serta dapat dimanfaatkan *bofertilizer*

I. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Kadmium

Kadmium adalah unsur dari kelompok IIB dalam Tabel periodik dan memiliki nomor atom yaitu empat puluh delapan. Kadmium memiliki persamaan kimia dengan elemen lain yang ada di kelompok IIB terutama zink (Zn) dan merkuri (Hg) (Baes dan Mesmer, 1976). Kadmium merupakan logam yang toksik terutama pada proses metabolisme (Al-yemni dkk., 2011). Keberadaan kadmium dalam tanah tergantung oleh jumlah logam pada batuan dimana tanah terbentuk, jumlah deposit logam dari atmosfer ke tanah, jumlah yang merembes ke dalam tanah lebih dalam dan jumlah mineral pada pupuk anorganik (Darmono, 2001). Kegiatan pertanian dan perkebunan turut menyumbang kontaminasi kadmium pada lingkungan karena penggunaan pupuk dan pestisida (Dokmeci dkk., 2009).

Kadmium dapat mudah diserap oleh akar tanaman dan ditransportasikan ke tunas yang menimbulkan ketidaknormalan proses biokimia dan fisiologis tanaman sehingga berpengaruh pada pertumbuhan tanaman serta morfologinya. Akar tanaman yang pertama kali terpapar logam berat daripada tunas sehingga dapat berpengaruh pada pertumbuhan dan morfologi akar tanaman (Ci, dkk., 2009). Konsentrasi logam Cd normal pada tumbuhan sekitar 0,05-0,2 mg/kg. Beberapa tanaman dapat mengakumulasi logam hingga di bawah 100 mg/kg pada berat kering tunas (Al-yemni dkk., 2011).

B. Karakteristik Bakteri

1. Morfologi Koloni Bakteri

Morfologi koloni bakteria termasuk bentuk koloni, ukuran, warna dan lain-lain. Morfologi sel bisa diamati di bawah mikroskop, termasuk pengecatan Gram (positif atau negatif), bentuk (*coccus* atau *rod*), organisasi (*single* atau berantai), adanya endospora dan posisinya (tengah atau pinggir), flagela (*polar* atau *peritrichous*) dan lainnya (Zourob, dkk., 2008). Ukuran koloni bakteri dapat menentukan pertumbuhan bakteri atau waktu generasi bakteri. Warna dari bakteri menunjukkan macam-macam variasi pigmen yang diproduksi oleh bakteri. Morfologi koloni bakteri juga menunjukkan hasil aktivitas enzim pada berbagai medium (Engelkirk dan Engelkirk, 2008).

2. Uji Biokimia

2.1 Uji Fermentasi Karbohidrat

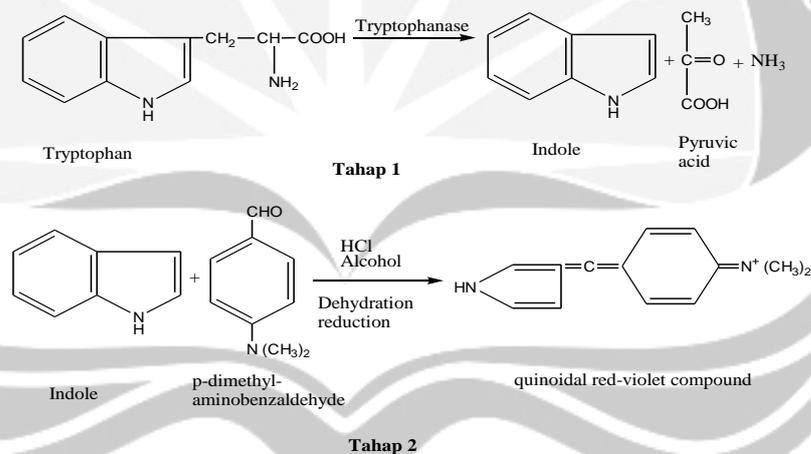
Fermentasi merupakan metabolisme bakteri dengan perantara molekul organik sebagai penerima elektron. Proses kimia yang terjadi juga dapat menghasilkan energi. Fermentasi karbohidrat oleh bakteri menghasilkan beberapa macam produk di antaranya gas (CO₂) dan asam. Beberapa bakteri menghasilkan asam dan gas atau asam saja (Pommerville, 2005)

Media yang digunakan yaitu *Nutrient Broth* yang ditambahkan dengan 0,5% karbohidrat yang akan difermentasikan. *Phenol red* sebagai indikator keasaman, apabila larutan berwarna merah menandakan netral dan warna kuning menandakan asam. Tabung Durham dimasukan dengan mulut tabung menghadap ke bawah, berfungsi untuk menangkap gas selama fermentasi berlangsung

(Pommerville, 2005). Indikasi adanya gas dengan terbentuknya gelembung pada tabung Durham (Vasanthakumari, 2005).

2.2 Uji Indol

Kemampuan organisme dalam mendegradasi asam amino triptofan menjadi indol dengan bantuan enzim triptofanase. Reaksi indol yang menghasilkan aldehyd akan menghasilkan produk akhir yang berwarna. Organisme yang memproduksi enzim triptofanase dapat mendegradasi asam amino triptofan menjadi asam piruvat, ammonia dan indol. Indol dideteksi dengan kombinasi indikator yang mengandung aldehyd untuk membentuk produk akhir yang berwarna (Csuros dan Csuros, 1999).



Gambar 1. Reaksi indol (Sumber : Jutono dkk., 1980)

Menurut Nagoba (2009), hasil positif dari uji indol ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna *pink* pada permukaan medium sedangkan pada hasil negatif ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna kuning pada permukaan medium.

Menurut Darmawati (2019), medium yang digunakan untuk uji indol adalah media triptofan cair atau media yang mengandung triptofan sebagai nutrisi cair

yang mengandung pepton. Reagen yang digunakan adalah reagen yang mengandung *p*-diemethylaminobenzaldehyde (PABA) kemudian membentuk kompleks warna merah (Gambar 1).

1.3 Uji Katalase

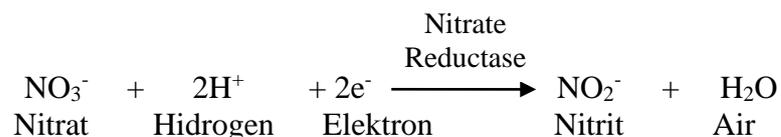
Beberapa bakteri mempunyai enzim katalase yang dapat mengkonversi hydrogen peroksida yang merupakan hasil produk beracun menjadi oksigen dan air (Kannan, 2016). Prinsip uji katalase adalah bakteri menggunakan enzim katalase merupakan hemoprotein untuk mengurai hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air. Kebanyakan bakteri aerobik merupakan katalase positif (Jain, dkk., 2018). Bakteri aerobik membutuhkan oksigen selama metabolisme sel. Oksigen dapat dikonversi menjadi hasil samping yang berbahaya seperti superoksida, hidrogen peroksida dan hidrosil radikal (Madigan dkk, 2015)



Hidrogen peroksida merupakan senyawa yang sangat bereaktif, pada konsentrasi tinggi. Pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan keracunan (Lund, dkk., 2000).

1.4 Uji Reduksi Nitrat

Bakteri aerobik dan fakultatif anaerob mereduksi nitrat tanpa adanya oksigen. Kondisi tersebut dinamakan respirasi anaerobik. Sel akan menggunakan zat inorganik seperti nitrat atau sulfat untuk menyediakan oksigen yang nantinya akan digunakan sebagai akseptor hidrogen selama pembentukan energi (Nagoba, 2009)



Uji reduksi nitrat digunakan untuk menentukan apakah bakteri dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit (Engelkirik dan Engelkirk, 2008). Terkadang reduksi berlanjut dan nitrit mereduksi nitrogen (Vasanthakumari, 2009).

Reduksi nitrat dapat ditentukan dengan menumbuhkan organisme dalam nitrat medium *broth*. Medium tersebut berisi *nutrient broth* ditambah dengan potassium nitrat (KNO₃) sebagai sumber nitrat. Dua reagen yang digunakan yaitu larutan *sulfanilic acid* dan larutan *alphanaphthylamine* (Nagoba, 2009). *Sulfanilic acid* bisa digunakan untuk mengilangkan nitrit dan dapat digunakan untuk reagen *diazotization* untuk deteksi nitrat sedangkan aminonaphthalene (*a-naphthylamine*) digunakan untuk penggabungan azo (Yakushiji dan Kanda, 1998). Adanya enzim nitrat reduktase yang mereduksi nitrat menjadi nitrit akan membentuk *nitrous acid* yang akan bereaksi dengan *sulfanic acid* kemudian bereaksi dengan *naphthylamine* sehingga membentuk warna merah (Reynolds, 2011).

3. Pengecatan Gram

Pada uji pengecatan Gram dapat ditentukan oleh adanya sel bakteri. Bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan yang tipis di bawah lapisan membran lemak. Pada perlakuan proses penghilangan warna, lapisan lemak rusak dan mengenai peptidoglikan. *Dye-iodine* dengan mudah keluar dari lapisan peptidoglikan yang tipis ini sehingga terjadi penghilangan warna. Sebaliknya, pada bakteri Gram positif hanya memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal sebagai dinding sel.

Lapisan peptidoglikan yang tebal tidak terpengaruh oleh proses penghilangan warna (Engelkirk dan Engelkirk, 2008).

Lapisan peptidoglikan yang tebal akan mengering dan menutup pori-pori sehingga *dye-iodin* kompleks tertahan meskipun setelah proses penghilangan warna (Kannan, 2016). Semakin tebal lapisan peptidoglikan pada dinding sel, semakin sulit menghilangkan kristal violet dari sel. Langkah penghilangan warna pada prosedur pengecatan akan melarutkan lemak pada dinding sel dari bakteri Gram negatif menyebabkan kristal violet mengalir keluar sel (Engelkirk dan Engelkirk., 2008).

Menurut Sumbali dan Mehrotra (2009), pada langkah awal pengecatan Gram digunakan kristal violet yang ditetaskan pada sampel kemudian dibilas dengan air. Iodin ditambahkan pada sampel merupakan zat yang meningkatkan interaksi antara sel dan larutan kristal violet sehingga warna dapat melekat kuat pada sel. Ketika iodin dibilas dengan air, antara bakteri Gram positif dan Gram negatif menunjukkan warna ungu kemudian sampel dibilas dengan larutan penghilang warna (larutan yang dapat menghilangkan warna utama) seperti ethanol 95% atau campuran ethanol dan aseton. Bakteri Gram negatif akan kehilangan warna dan menjadi transparan kemudian langkah terakhir digunakan larutan safranin yang memberi warna pada sampel yang kehilangan warna.

Pada pewarnaan Gram, bakteri Gram positif akan berwarna biru keunguan dan bakteri gram negatif berwarna merah atau merah muda. Bakteri Gram negatif mengandung lipopolisakarida pada dinding sel, alkohol dapat melarutkan lapisan lipopolisakarida sehingga membuat krastal violet-iodine kompleks masuk ke

lapisan peptidoglikan yang tipis. Sebaliknya, bakteri gram positif memiliki lapisan lemak yang lebih tipis dan peptidoglikan (kompleks karbohidrat) yang lebih tebal pada dinding sel, sehingga kristal-violet dapat tertahan. Gram negatif selalu gagal dalam menahan kristal violet sementara bakteri Gram positif menunjukkan berbagai reaksi (gram-variable reaction). Misalnya kultur bakteri Gram positif yang sudah tua akan kehilangan kemampuan untuk menahan kristal violet sehingga safranin yang akan tertahan (Sumbali dan Mehrotra, 2009).

C. Fitoremediasi

Fitoremediasi merupakan penggunaan tanaman untuk mengurangi kontaminasi pada tanah, lumpur, sedimen dan air. Fitoremediasi pada tanah yang terkontaminasi dibantu oleh bakteri dengan meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui produksi hormon pertumbuhan tanaman seperti *indole acetic acid* dan sitokinin, nutrisi pokok yang dilepaskan melalui fiksasi nitrogen, produksi siderofor dan kelarutan fosfat, serta menurunkan stres pada tanaman melalui produksi etilen. (Environmental Protection Agency, 1999). Menurut Hidayat (2005), karakteristik tumbuhan hiperakumulator adalah: (i) tahan terhadap unsur logam dalam konsentrasi tinggi pada jaringan akar dan tajuk; (ii) tingkat laju penyerapan unsur dari tanah yang tinggi dibanding tanaman lain; (iii) memiliki kemampuan mentranslokasi dan mengakumulasi unsur logam dari akar ke tajuk dengan laju yang tinggi. Pada kondisi normal konsentrasi Zn, Cd, atau Ni pada akar adalah 10 kali lebih tinggi dibanding konsentrasi pada tajuk, tetapi pada tumbuhan hiperakumulator, konsentrasi logam pada tajuk melebihi tingkat konsentrasi pada akar. Menurut Estuningsih dkk. (2013), faktor-faktor yang

mempengaruhi keberhasilan fitoremediasi yaitu kemampuan daya akumulasi berbagai jenis tanaman untuk berbagai jenis polutan dan konsentrasi; sifat kimia dan fisika, serta sifat fisiologi tanaman; jumlah zat kimia berbahaya; mekanisme akumulasi dan hiperakumulasi ditinjau secara fisiologi, biokimia, dan molekular; serta penggunaan konsentrasi limbah yang tepat sangat menentukan keberhasilan pada proses fitoremediasi.

Menurut Barceló dan Poschenrieder (2014) salah satu teknik fitoremediasi adalah rhizofiltrasi dan rhizodegradasi. Rhizofiltrasi berperan pada pembersihan kontaminasi melalui penyerapan oleh akar. Rhizodegradasi berperan pada dekomposisi kontaminan organik dengan bantuan mikroorganisme pada daerah *rhizosphere*.

D. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)

Mikroorganisme dapat meningkatkan resistensi terhadap kadmium dan hidup mendominasi pada tanah yang terkontaminasi kadmium. Bakteri yang resisten terhadap konsentrasi tinggi kadmium dan memiliki kemampuan untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman di bawah kondisi stres kadmium disebut PGPR tahan kadmium. PGPR tahan kadmium dapat mengurangi penyerapan terhadap tanaman dan ditranslokasikan ke bagian aerial tanaman. Bakteri yang tujuannya untuk melindungi tanaman dari tekanan kadmium harus resisten terhadap kadmium, dapat mengikat Cd^{2+} bebas, aktif berkolonisasi pada permukaan akar dan atau *rhizosphere*, dan memiliki mekanisme/sifat PGPR (Sharma dan Archana, 2016).

Plant Growth Promoting Bacteria memiliki mekanisme di antaranya kelarutan fosfat, menghasilkan hormon pertumbuhan *Indole Acetic Acid*, amonia, siderofor, aktivitas enzim yang dapat mendegradasi dinding seperti selulase, kitinase dan protease. Adanya mekanisme produksi IAA dan siderofor, bakteri akan lebih cepat melakukan fitoremediasi pada tanah yang terkena kontaminasi logam berat. Produksi IAA yang merupakan fitohormon adalah karakteristik dari PGPR. Adanya IAA dapat meningkatkan penyerapan logam pada akar tanaman. (Putrie, 2016).

Menurut Khan dkk., (2009), mekanisme bakteri PGPR tahan logam berat adalah eksklusi, ekstrusi, akomodasi, biotransformasi dan metilasi atau demetilasi. Bakteri dapat meningkatkan kelarutan logam dengan memproduksi asam dan mendetoksifikasi logam. Mekanisme eksklusi terjadi ketika menjauhkan ion logam terhadap target, mekanisme ekstrusi terjadi ketika ion logam dikeluarkan dari sel melalui kromosom/plasmid, mekanisme akomodasi ketika ion logam diikat oleh protein atau komponen sel lain, mekanisme biotransformasi ketika terjadi pengurangan senyawa racun pada logam kemudian terjadi mekanisme metilasi dan demetilasi.

Auksin secara alami terdapat pada tumbuhan sebagai asam *indol-3-asetat* atau IAA (Mehmood, dkk., 2017). Auksin atau IAA (*indole-3-acetic acid*) adalah salah satu fitohormon yang diproduksi oleh PGPR dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman. PGPR yang memproduksi IAA telah diaplikasikan untuk meningkatkan kemampuan tumbuhan fitoremediator pada tanah yang terkontaminasi logam berat. Adanya IAA pada tanah yang terkontaminasi logam

berat dapat meningkatkan penyerapan logam tersebut pada akar tanaman (Dorjey, dkk., 2017).

Indole Acetic Acid (IAA) merupakan hormon dari kelompok auksin yang memacu perpanjangan sel dan pembentukan akar lateral (Mehmood, dkk., 2017). IAA diproduksi melalui metabolisme L-Tryptophan oleh berbagai mikroorganisme tanah seperti bakteri, jamur dan alga. Mikroorganisme rhizosphere bekerjasama tanaman mensintesis dan melepaskan auksin sebagai metabolit sekunder karena adanya eksudat di akar (Difluza, 2011).

Tanaman yang berbeda merespon macam-macam konsentrasi auksin yang berbeda serta jenis mikroorganismenya. IAA dalam jumlah yang rendah yang dihasilkan oleh PGPR dapat merangsang pertumbuhan akar sementara IAA dalam jumlah tinggi dapat menghambat pertumbuhan akar (Difluza, 2011). Menurut Pilet dan Saugy (1985), pemanjangan akar berbanding terbalik dengan konsentrasi IAA eksogen di atas 10^{-6} hingga 10^{-9} M. Apabila sudah di atas 10^{-6} hingga 10^{-9} M, maka pertumbuhan akar seringkali terhambat.

Bakteri *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes piechudii* dan dua strain dari *Comamonas acidovorans* mensekresikan IAA pada level rendah (Khan dkk., 2009). Menurut Barea dan Brown (1974), *Azotobacter paspali* meningkatkan berat kering pada tunas dan akar dengan memproduksi IAA. Menurut Dorjey dkk. (2017) *Pseudomonas putida* memproduksi IAA dengan level rendah dan merangsang pertumbuhan bibit canola. Menurut Pillet dkk. (1985) penambahan inokulasi *Pseudomonas* spp. merangsang pertumbuhan

tanaman dengan mengurangi penyerapan ion yang berbahaya dan meningkatkan auksin.

Keberadaan IAA dapat ditunjukkan reaksi positif pada penambahan Reagen Salkowski yang menunjukkan warna ke-merah muda-an atau merah tua. Larutan reagen Salkowsky merupakan larutan HClO_4 mengandung 10 mM yang ketika bergabung dengan IAA, tris-(indole-3-acetato)iron(III) kompleks terbentuk dan menunjukkan warna merah muda. Reaksi positif pada uji IAA mengindikasikan bahwa adanya perubahan L-Tryptophan menjadi IAA (Rahman dkk., 2010).

Bakteri yang memiliki kemampuan produksi siderofor penting untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan tanaman pada tanah yang terkontaminasi logam sehingga dapat mengurangi gejala keracunan logam dan menyediakan nutrisi bagi tanaman. Bakteri penghasil siderofor dapat mengikat logam selain besi maka dari itu bakteri dapat hidup pada lahan bekas tambang (Yu dkk., 2014).

Besi merupakan nutrisi penting yang dibutuhkan untuk makhluk hidup namun di tanah besi tidak tersedia untuk bakteri karena *ferric iron* (FeIII) yang mendominasi dan hanya sedikit yang larut dan konsentrasinya terlalu rendah untuk pertumbuhan bakteri. Untuk bertahan hidup, bakteri tanah mensintesis dan mengeluarkan senyawa pengikat besi yang dinamakan siderofor. Siderofor mengikat FeIII dengan daya tarik yang tinggi kemudian bakteri akan mengeluarkan siderofor untuk mengambil *iron siderophore* kompleks dengan menggunakan reseptor yang spesifik dan reseptor tersebut terletak diluar membran sel bakteri. Setelah masuk ke sel, besi akan dilepaskan dan dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroba. Mikroba yang menghasilkan siderofor

memiliki struktur yang sama dengan bakteri lain namun kebanyakan mengandung hidroksimat dan gugus katekol yang terlibat dalam pengkhelatan besi (Siddiqui, 2006).

Deteksi pada uji siderofor dapat dilakukan dengan menambahkan FeCl_3 pada kultur supernatan sehingga menghasilkan warna. Pada metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi gugus enol, fenol, katekolat dan hidroksimat yang reaktif terhadap ferric iron (Podila dan Varma, 2005). Warna siderophore-iron kompleks akan terbentuk ketika terjadi penambahan sedikit volume kultur supernatan (1-2 ml) ditambahkan iron chloride ($0,5 \mu\text{l}$ dari FeCl_3). Warna yang akan terbentuk pada *Pseudomonas* yang menghasilkan siderofor bervariasi yaitu kuning menuju ke orange. (Montie, 1998). Meskipun beberapa macam siderofor dapat dideteksi pada metode ini namun metode ini tidak dapat mendeteksi siderofor dalam jumlah yang sedikit (Podila dan Varma, 2005).

Kelarutan fosfat pada strain *Pseudomonas* sp. dapat berfungsi ketika fosfat pada tumbuhan terbatas. Strain *Pseudomonas* sp. dapat melarutkan kompleks fosfat serta melepaskan fosfat dari sumber organik melalui enzim *phosphatase*. Pelarutan fosfat terjadi ketika produksi asam organik dan fosfat organik melepaskan fosfat dibantu oleh asam-basa *phosphatase* (Dorjey dkk., 2017).

Fosfor merupakan nutrisi paling penting untuk tanaman setelah nitrogen dan memacu mekanisme pertumbuhan tanaman. Fosfat biasanya tersedia dalam bentuk anorganik sehingga tanaman tidak bisa menyerap secara langsung. PGPR memiliki peran penting untuk membuat fosfor yang tidak tersedia dalam tanah melalui enzim *phytase* atau memproduksi asam organik sehingga mempengaruhi

mobilitas fosfor dengan interaksi ionik lalu membebaskan enzim ekstraseluler dan melepaskan fosfatase yang mana akan membantu untuk melepaskan gugus fosfat dari zat organik. Mekanisme bakteri yang melarutkan fosfat meliputi pelepasan asam organik dan menyebabkan fosfor tersedia pada tanaman yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman. (Singh dkk., 2019).

Diantara keseluruhan populasi mikroba di tanah, bakteri pelarut fosfat ada sekitar 1-50% sementara jamur pelarut fosfat hanya sekitar 0,1 – 0,5 % (Egamberdieva, dkk., 2015). Genus bakteri yang dapat melarutkan fosfat adalah *Bacillus*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodcoccus*, dan *Serratia*. Penginokulasian bakteri pelarut fosfat dapat dilakukan bakteri itu sendiri atau dikombinasikan dengan bakteri rhizosfer lain (Singh dkk., 2019).

Aktivitas kelarutan fosfat pada bakteri dapat ditentukan dengan menggunakan agar Pikovskaya yang mengandung endapan kalsium fosfat. Kultur bakteri ditumbuhkan pada agar pikovskaya kemudian diinkubasi 3-14 hari. Adanya zona bening di sekitar koloni bakteri sebagai indikator positif melarutkan fosfat (Eichinger, dkk., 2016).

Rendahnya penyerapan zat besi pada tanaman yang berada pada kondisi tanah yang terkontaminasi logam berat bisa menyebabkan klorosis sehingga dapat berpengaruh pada biosintesis klorofil dan perkembangan kloroplas. Bakteri yang dapat memproduksi siderofor dapat menjadi sumber zat besi untuk tanaman yang tumbuh pada kondisi yang tercemar logam berat sehingga dapat mencegah klorosis. Adanya PGPR pada tanah yang terkontaminasi logam berat dapat

meningkatkan kandungan zat besi pada tanaman kemudian dapat meningkatkan klorofil serta pertumbuhan tanaman (Dorjey, dkk., 2017).

Penambahan PGPR pada penelitian Hindersah dkk.,(2017) yaitu *Azotobacter* sp. *Azotobacter* sp. sebagai PGPR dapat membantu meningkatkan pertumbuhan tanaman pangan padi melalui fiksasi nitrogen dan produksi fitohormon selain itu memiliki resistensi terhadap logam berat. Tanaman padi yang di inokulasi dengan *Azotobacter* sp., serapan N meningkat tetapi serapan kadmium menurun.

Bacillus amyloliquefaciens SAY09 yang termasuk bakteri PGPR dapat meningkatkan resistensi kadmium dengan auksin endogen pada tanaman *Arabidopsis* lalu mengaktifkan mekanisme fiksasi kadmium di dinding sel akar dan penyerapan Fe. *Bacillus amyloliquefaciens* SAY09 meningkatkan mobilisasi dinding sel penyerapan Fe dan peningkatan kadar Fe terlarut di bawah tekanan kadmium, sehingga memungkinkan lebih banyak polisakarida dinding sel untuk mengikat kadmium. Efek yang nampak adalah memperbaiki klorosis pada daun (Zhou dkk., 2017).

Adanya bakteri *Providencia* spp., *Morganella* sp., *Stenotrophomonas* sp., dan *Bacillus* sp. pada tanaman *Sesbania bispinosa* yang tahan terhadap kadmium pada konsentrasi tinggi. Bakteri tersebut memiliki mekanisme PGPR sehingga dapat bertahan pada tanah yang terkontaminasi logam. Mekanisme PGPR yang dimiliki yaitu produksi IAA, siderofor, kelarutan fosfat dan potassium (Kartika dkk., 2016).

E. Deskripsi Tanaman Biduri (*Calotropis Gigantea*)

Tanaman biduri merupakan jenis tanaman semak liar yang hidup di daerah tropis tepatnya pada lahan kering. Ciri-ciri tanaman biduri merupakan tanaman perdu berakar tunggang, dengan daun berbentuk bulat telur atau bulat panjang serta pertulangan daunnya menyirip pada batang (Lazar, 2015). Tanaman ini memiliki kemampuan untuk menyerap logam dan meneruskan ke jaringannya namun tanaman ini cukup toleransi terhadap logam berat. Daun *Calotropis gigantea* digunakan sebagai bioabsorben untuk logam Cr(III) pada buangan industri (Kala, 2014).

Tanaman biduri merupakan tanaman *xerofit* yang dapat tumbuh sepanjang musim dan cepat mengalami pertumbuhan untuk praktik remediasi (D'Souza dkk., 2010). Menurut Badr dkk. (2012), tanaman biduri ini memiliki *bioaccumulation factor* (BAF) Cd tertinggi dibandingkan tanaman lainnya yaitu sebesar 41,5. *Translocation factor* (TAF) tanaman biduri juga lebih tinggi dari tanaman lain yaitu sekitar 61,8.

Pada penelitian Kala (2014) ditemukan bakteri di daerah *rhizosphere* yaitu *Pseudomonas* sp. yang baik dalam mendegradasi naphtalene (78,44%) dan anthracene (63,53%) yang dideteksi dengan menggunakan HPLC. Hal tersebut menandakan daerah *rhizosphere* pada *Calotropis* sp. merupakan sumber *Pseudomonas* sp. yang berpotensi sebagai agen PGPR, mampu mendegradasi PAH dan sebagai biokontrol untuk fungi.

F. Hipotesis

1. Isolat bakteri yang terdapat pada akar tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) yang tahan terhadap kadmium adalah *Pseudomonas* sp.
2. Potensi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* dapat dilihat dari kemampuannya melarutkan fosfat, menghasilkan *Indole Acetic Acid* dan siderofor.

