

BABI PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang mendukung pembangunan pertanian berkelanjutan. Kementerian Pertanian Republik Indonesia melalui Peraturan Menteri Pertanian (Permentan) Nomor 01 Tahun 2019 mendorong peningkatan produksi pupuk hayati sebagai upaya untuk mewujudkan pertanian berkelanjutan (Kementerian Pertanian Republik Indonesia, 2019). Pupuk hayati merupakan pupuk yang secara alami mampu memberikan nutrisi bagi tanaman dan meningkatkan kesuburan tanah karena didukung oleh bakteri hidup yang terkandung didalamnya (Barman *et al.*, 2017; Nath *et al.*, 2020). Bakteri yang diketahui dapat bersimbiosis dan berdampak positif terhadap pertumbuhan tanaman tersebut dikelompokkan sebagai bakteri pemicu pertumbuhan tanaman atau *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB).

PGPB memiliki berbagai mekanisme pemicu pertumbuhan tanaman baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tidak langsung, PGPB dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui produksi senyawa antijamur seperti 2,4-diacetylphloroglucinol untuk melawan patogen pada tanaman (Yadav, 2017). Sementara itu, mekanisme pemicu pertumbuhan tanaman secara langsung oleh PGPB terdiri dari penyediaan mikronutrien, pelarut fosfat, penambat nitrogen dan menghasilkan hormon tumbuhan (Olanrewaju *et al.*, 2017; Tsukanova *et al.*, 2017; Thomas dan Singh, 2019). Salah satu hormon tumbuhan yang dapat dihasilkan oleh PGPB yaitu auksin.

Tanaman secara alami dapat memproduksi auksin yang disebut sebagai auksin endogen (Simon dan Petrášek, 2011). Akan tetapi, tambahan auksin eksogen yang disintesis di luar sel tanaman juga dibutuhkan untuk menghadapi cekaman biotik maupun abiotik sekaligus meningkatkan produktivitas tanaman. Auksin eksogen dapat diaplikasikan oleh manusia secara langsung pada tanaman atau juga dapat diperoleh melalui interaksi tanaman dengan PGPB (Ludwig-Müller, 2015). Auksin yang dihasilkan oleh PGPB dimanfaatkan oleh tumbuhan dalam simbiosis PGPB dengan tanaman. Auksin tersebut juga bermanfaat dalam

mekanisme pertahanan tanaman terhadap cekaman lingkungan (Duca dan Glick, 2020).

Salah satu isolat PGPB koleksi Universitas Andalas yaitu *Serratia plymuthica* UBCF_13 yang selanjutnya disingkat sebagai UBCF_13 (Aisyah *et al.*, 2019). Isolat UBCF_13 pertama kali diisolasi dari daun *Brassica juncea* dan diketahui dapat menghasilkan senyawa antijamur. Produksi senyawa antijamur UBCF_13 telah dilakukan optimasi berdasarkan kondisi sumber nutrisi media kultur, pH dan durasi kultur (Aisyah *et al.*, 2017, Aisyah *et al.*, 2019; Apridiana *et al.*, 2021; Darmawan *et al.*, 2021; Sulastri *et al.*, 2021). Selain itu, studi genomik dan proteomik juga telah dilakukan terhadap protein *Chitinase* yang berperan dalam penguraian senyawa kitin pada dinding sel jamur. Gen pengkode *Chitinase* yang berhasil diisolasi dari genom UBCF_13 terdiri dari *chitinase-A*, *chitinase-B* dan *chitinase* putatif (Fatiah *et al.*, 2020; Oktavioni *et al.*, 2020; Rohinda *et al.*, 2021).

Kemampuan PGPB lainnya yang dimiliki oleh isolat UBCF_13 yaitu mampu memproduksi auksin (Aisyah *et al.*, 2019). Salah satu jenis auksin yang diproduksi oleh UBCF_13 yaitu *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) dan telah dilakukan optimasi berdasarkan durasi kultur dan penambahan senyawa prekursor. Hasilnya diketahui bahwa durasi kultur 48 jam pada media *Luria Bertani* (LB) yang ditambahkan triptofan 200 µg/ml merupakan kondisi optimum produksi IAA UBCF_13 (116,09 µg/ml) (Aisyah *et al.*, 2019). Optimasi produksi IAA kemudian dilanjutkan berdasarkan perbedaan pH dengan durasi kultur dan media yang sama pada penelitian sebelumnya. Hasil penelitian tersebut menunjukkan pH 6 merupakan pH yang optimal (24,13 µg/ml) namun terjadi penurunan produksi IAA yang signifikan dari penelitian sebelumnya (Wandira *et al.*, 2021). Untuk meningkatkan kembali produksi IAA UBCF_13 maka optimasi dilanjutkan berdasarkan perbedaan jenis media, konsentrasi triptofan, pH, penambahan *wall affecting agent*, dan pemberian ion logam. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa media *Yeast Mannitol* (YM) dengan penambahan 300 µg/ml triptofan dan 0,1 % CaCl₂ menghasilkan IAA sebesar 107,01 µg/ml (Yusfi *et al.*, 2021). Untuk mengetahui penyebab terjadinya peningkatan dan penurunan

produksi IAA berdasarkan percobaan optimasi yang telah dilakukan sebelumnya maka diperlukan informasi mengenai regulasi jalur biosintesis IAA UBCF₁₃.

Jalur biosintesis IAA pada bakteri terdiri dari jalur bergantung triptofan dan tidak bergantung triptofan. Umumnya mikroorganisme menghasilkan IAA melalui jalur bergantung triptofan yang terdiri dari jalur *indole-3-pyruvic acid* (IPyA), *tryptamine* (TAM), *indole-3-acetaldoxime* (IAOx)/ *indole-3-acetonitrile* (IAN), dan *indole-3-acetamide* (IAM) (Duca dan Glick, 2020). Studi terkait regulasi jalur biosintesis IAA pada bakteri telah dipelajari melalui pendekatan genomik, transkriptomik, proteomik, dan metabolomik. Secara garis besar, terdapat tiga metode yang umum digunakan untuk mempelajari jalur biosintesis IAA yaitu *next generation sequencing* (NGS), kloning gen dan *knockout* gen. Akan tetapi, ketiga metode tersebut memiliki beberapa kekurangan. Selain memerlukan waktu dan biaya yang cukup besar, metode NGS, kloning, dan *knockout* gen hanya dapat digunakan dalam mempelajari regulasi jalur biosintesis IAA pada bakteri. Sementara itu, untuk memperoleh informasi terkait faktor yang mempengaruhi produksi IAA maka diperlukan proses optimasi yang dilakukan secara terpisah.

Optimasi media kultur penting dilakukan sebagai tahap awal dalam pengembangan pupuk hayati dan produksi auksin berskala industri (Bunsangiam *et al.*, 2021; Hossain *et al.*, 2023). Beberapa faktor yang mempengaruhi produksi IAA diantaranya durasi kultur, suhu, pH, konsentrasi triptofan, sumber karbon, nitrogen dan mineral (Baliyan *et al.*, 2021; Chaudhary *et al.*, 2021; Bessai *et al.*, 2022). Optimasi produksi IAA telah dikaji pada berbagai isolat bakteri diantaranya *Serratia marcescens*, *Bacillus siamensis*, *Kosakonia pseudosacchari* TCPS-4, *Bacillus* spp., rhizobakteri dari *Holarrhena pubescens*, *Pseudomonas fluorescens*, rhizobakteri dari tanaman kopi, dan *Pantoea agglomerans* CPHN2 (Hasuty *et al.*, 2018; Suliasih dan Widawati, 2020; Baliyan *et al.*, 2021; Chaudhary *et al.*, 2021; Chowdhury dan Mazumdar, 2022; Bessai *et al.*, 2022; Waday *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2023). Akan tetapi, penyebab terjadinya peningkatan produksi IAA oleh proses optimasi belum dikaji secara molekuler.

Oleh karena itu, penelitian ini menggabungkan proses optimasi produksi IAA dengan analisis transkriptomik dan metabolomik untuk memperoleh kondisi

kultur terbaik dalam produksi IAA sekaligus mengetahui jalur sintesis IAA pada UBCF_13. Penentuan jalur biosintesis IAA UBCF_13 dimulai dengan identifikasi gen – gen terlibat produksi IAA melalui *genome mining* pada genom UBCF_13. Selanjutnya level ekspresi gen yang berhasil diidentifikasi dianalisis lebih lanjut menggunakan qRT-PCR berdasarkan beberapa perlakuan optimasi yang terdiri dari optimasi durasi kultur dan komposisi media. Selain itu, senyawa intermediet terkait biosintesis IAA dapat diidentifikasi dan dianalisis lebih lanjut berdasarkan perlakuan optimasi waktu kultur, komposisi media dan prekursor menggunakan HPLC. Gabungan analisis transkriptomik dan metabolomik ini diharapkan dapat membantu menentukan pemetaan sekaligus regulasi jalur biosintesis IAA oleh UBCF_13 secara spesifik. Selain itu, hasil optimasi waktu kultur dan komponen media kultur dapat digunakan dalam pengembangan pupuk hayati maupun produksi IAA berskala industri. Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukanlah penelitian dengan judul “Studi Jalur Produksi *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) pada *Serratia plymuthica* UBCF_13”.

1.2. Masalah Penelitian

Studi terkait PGPB penghasil fitohormon khususnya auksin/IAA telah dikembangkan pada berbagai spesies bakteri dan diaplikasikan untuk memicu pertumbuhan berbagai tanaman. Kemampuan produksi IAA pada PGPB dapat ditingkatkan melalui optimasi kondisi kultur. Optimasi suhu, pH, durasi kultur, dan komponen media kultur merupakan tahapan fundamental untuk meningkatkan produksi IAA oleh PGPB. Adanya peningkatan produksi IAA tersebut menunjukkan bahwa proses optimasi dapat mempengaruhi regulasi jalur sintesis IAA. Oleh karena itu, informasi terkait pengaruh proses optimasi kondisi kultur terhadap ekspresi gen – gen dan metabolit yang terlibat di dalam jalur biosintesis IAA penting untuk dipahami. Pengaruh proses optimasi kondisi kultur terhadap ekspresi gen dan metabolit pada jalur biosintesis IAA juga dapat digunakan untuk menganalisis secara spesifik jalur biosintesis IAA yang digunakan oleh PGPB. Informasi terkait jalur spesifik biosintesis IAA sekaligus kondisi kultur optimal ini menjadi dasar untuk pengembangan bakteri penghasil IAA sebagai pupuk hayati maupun bioindustri.

Berdasarkan identifikasi masalah yang telah dipaparkan di atas maka dapat dirumuskan permasalahan pada penelitian ini yaitu:

1. Gen – gen apa saja yang diduga terlibat di dalam jalur biosintesis IAA UBCF_13 berdasarkan *genome mining*?
2. Bagaimana profil ekspresi gen dan metabolit yang terlibat di dalam jalur biosintesis IAA UBCF_13 berdasarkan perlakuan perbedaan durasi kultur?
3. Bagaimana profil ekspresi gen dan metabolit yang terlibat di dalam jalur biosintesis IAA UBCF_13 berdasarkan perlakuan sumber karbon, nitrogen, dan mineral?
4. Bagaimana kondisi dan komposisi media kultur optimal yang spesifik untuk produksi IAA oleh UBCF_13 berdasarkan kombinasi dari proses optimasi tersebut? dan
5. Bagaimana profil metabolit yang dihasilkan berdasarkan penggunaan berbagai senyawa *indole* sebagai prekursor untuk menganalisis secara spesifik jalur biosintesis IAA pada UBCF_13?.

1.3. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memetakan regulasi jalur biosintesis IAA pada UBCF_13 berdasarkan analisis transkriptomik dan metabolomik serta menentukan kondisi kultur optimal untuk pengembangan produksi IAA pada isolat tersebut.

2. Tujuan Khusus

Secara khusus, penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi gen – gen yang diduga terlibat di dalam jalur biosintesis IAA UBCF_13 berdasarkan *genome mining*.
2. Menganalisis profil ekspresi gen dan metabolit yang terlibat di dalam jalur biosintesis IAA UBCF_13 berdasarkan perlakuan perbedaan durasi kultur.
3. Menganalisis profil ekspresi gen dan metabolit yang terlibat di dalam jalur biosintesis IAA UBCF_13 berdasarkan perlakuan optimasi media produksi IAA (sumber karbon, nitrogen, dan mineral).

4. Menemukan kondisi dan komposisi media kultur optimal untuk produksi IAA oleh UBCF_13 berdasarkan kombinasi dari proses optimasi tersebut yang telah dibuktikan oleh uji kolorimetri, transkriptomik dan metabolomik.
5. Menganalisis secara spesifik jalur biosintesis IAA (jalur IPA, IAM, TAM dan IAN) pada UBCF_13 melalui analisis HPLC dengan menggunakan berbagai senyawa *indole* sebagai prekursor.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Untuk kepentingan ilmu pengetahuan

Informasi terkait kondisi kultur optimal dan pendekatan -omik (transkriptomik dan metabolomik) dapat digunakan dalam pengembangan produksi IAA UBCF_13 pada tahap selanjutnya. Informasi jalur biosintesis IAA akan membantu penelitian selanjutnya dalam melakukan rekayasa pada bakteri untuk peningkatan kemampuan produksi IAA pada strain ini. Kondisi kultur yang optimal untuk pertumbuhan dan produksi IAA oleh bakteri ini juga bermanfaat dalam pengembangan produksi IAA dengan memanfaatkan bioreaktor.

Selain itu, penelitian ini juga memberikan pendekatan alternatif dalam mempelajari regulasi jalur biosintesis sekaligus optimasi produksi metabolit pada bakteri. Analisis transkriptomik bermanfaat dalam mempelajari regulasi ekspresi gen pada jalur biosintesis metabolit dan didukung dengan terbentuknya senyawa produk melalui analisis metabolomik.

2. Untuk kepentingan praktis

Kondisi kultur optimal untuk produksi IAA oleh strain UBCF_13 dapat digunakan sebagai salah satu parameter dalam produksi senyawa IAA untuk skala industri dan komersialisasi. Oleh karena itu, hasil penelitian ini juga dapat mendukung upaya pemerintah mewujudkan pertanian berkelanjutan yang memanfaatkan pupuk organik sebagai pengganti pupuk kimia yang berbahaya bagi lingkungan.

1.5. Kebaharuan (*Novelty*) Penelitian

Studi terkait regulasi jalur produksi IAA pada bakteri dapat dianalisis menggunakan berbagai metode diantaranya *next generation sequencing* (NGS),

kloning gen, dan *knockout* gen. Akan tetapi, metode tersebut tidak dapat digunakan sekaligus untuk mengetahui kondisi optimal dalam produksi IAA. Penelitian ini menggabungkan proses optimasi produksi IAA dengan analisis transkriptomik dan metabolomik untuk memperoleh kondisi kultur terbaik dalam produksi IAA sekaligus mengetahui jalur sintesis IAA pada UBCF₁₃.

Oleh karena itu, penelitian ini menyajikan kebaruan metode untuk mengetahui regulasi jalur produksi IAA melalui data ekspresi gen dan profil metabolit spesifik yang dihasilkan selama proses optimasi kultur produksi IAA. Adapun jalur biosintesis IAA putatif UBCF₁₃ yaitu jalur IAM dimana gen *nthA*, *nthB* dan *amiE* masing – masing mengalami peningkatan level ekspresi pada perlakuan optimasi kultur produksi IAA. Selain itu, penelitian ini juga menghasilkan kebaruan pada kondisi kultur optimal (durasi kultur 21 jam dan komponen media kultur baru untuk produksi IAA yang terdiri dari sukrosa, *yeast extract*, magnesium sulfat dan kalsium karbonat).

