

Produksi IAA oleh *Rhizobium* sp. dalam medium sintetik dan serum lateks dengan suplementasi triptofan

Indole acetic acid production by Rhizobium sp. on synthetic and latex serum media with tryptophan supplementation

SUHARYANTO¹⁾, TRI-PANJI¹⁾ & GUSNANIAR²⁾

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Summary

The utilization of latex effluent to produce bioproduct like indole acetic acid (IAA) will reduce amount of effluent, as well as effluent processing cost and produce an economically profitable product. IAA could be produced by some rhizosphere microbes that could grow on latex effluent using L-tryptophan (Trp) as its precursor. The aim of this research is to determine potential growth and capability of IAA production by *Rhizobium* spp. R6 and KT on synthetic and latex serum media supplemented with pure Trp and with litter poultry manure as a cheap source of Trp. The research covered examination of IAA producing *Rhizobia* using liquid synthetic media supplemented with 0.07 g/L and 0.14 g/L Trp. The potential *Rhizobium* sp. in producing IAA was then inoculated into latex serum media supplemented with pure Trp and Trp from litter poultry manure. Result of the research showed that the highest IAA production was reached as much as 51.08 µg/mL in synthetic media supplemented with 0.14 g/L Trp inoculated with *Rhizobium* sp. R6. IAA could be produced as much as 6.63 µg/mL in pasteurized undiluted latex serum media supplemented with 0.14 g/L Trp. Using latex serum media supplemented with Trp from litter poultry manure showed that *Rhizobium* sp. R6 could produce 11.91 µg/mL. Supplementation of pure synthetic Trp in IAA

production could be replaced with litter poultry manure as a cheap source of Trp.

[Key word: IAA, *Rhizobium* sp., latex effluent, litter- poultry manure]

Ringkasan

Pemanfaatan limbah lateks menjadi produk bio seperti asam indol asetat (IAA), dapat mengurangi volume limbah, menekan biaya pengolahan limbah, serta menghasilkan produk yang bernilai ekonomis. IAA dapat dihasilkan oleh beberapa mikroba rhizosfer yang mampu tumbuh dalam limbah lateks dengan L-triptofan (Trp) sebagai prekursor-nya. Penelitian bertujuan menetapkan potensi pertumbuhan dan produksi IAA oleh *Rhizobium* spp. R6 dan KT dalam medium sintetik dan serum lateks yang disuplementasi Trp sintetik dan kotoran ayam sebagai sumber Trp murah. Isolat potensial dalam produksi IAA kemudian ditumbuhkan dalam medium serum lateks pekat yang disuplementasi Trp murni dan Trp dari kotoran ayam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi IAA tertinggi diperoleh dalam medium sintetik oleh *Rhizobium* sp. R6, sebesar 51,08 µg/mL. IAA dapat diproduksi sebesar 6,63 µg/mL dalam medium serum lateks 100% + Trp 0,14 g/L yang dipasteurisasi. Dalam medium serum lateks yang disuplementasi Trp dari kotoran

ayam, produksi IAA *Rhizobium* sp. R6 dapat mencapai 11,91 µg/mL. Suplementasi Trp murni dalam produksi IAA dapat digantikan dengan kotoran ayam sebagai sumber Trp yang murah.

Pendahuluan

Komoditas lateks pekat akhir-akhir ini makin diminati seiring dengan meningkatnya penggunaan sarung tangan sebagai pelindung penyakit infeksi (HIV/AIDS, flu burung dan flu babi) dan produk industri celup lainnya (benang karet, karpet, lateks busa). Pada harga normal produk lateks pekat mendapat premi 150 cent US\$/kg di atas RSS 1. Meskipun produksi lateks pekat ini relatif kecil, limbah cair yang dihasilkan merupakan pencemar potensial dengan nilai COD tinggi yaitu lebih dari 25.000 ppm serta kandungan N total di atas 4000 ppm (Darussamin *et al.*, 1988). Teknologi pengolahan limbah lateks pekat di lapangan saat ini umumnya dirancang pada akhir proses (*end of pipe treatment*) dan belum menerapkan prinsip 4R (*reduce, reuse, recycling & recovery*) untuk mengintegrasikan pemanfaatannya secara efektif menghasilkan produk yang bernilai ekonomis. Limbah lateks pekat kaya protein, lipid, karbohidrat dan mineral seperti Mg, P, K, Ca (Jacob *et al.*, 1993). Protein hidrolisat dalam serum lateks diketahui dapat digunakan sebagai sumber N organik pada medium tumbuh mikroalga *Spirulina* untuk produksi asam gamma linolenat (Tri-Panji *et al.*, 1996) dan karotenoid (Tri-Panji & Suharyanto, 2000). Dilihat dari komposisi kimianya, limbah tersebut juga berpotensi untuk medium tumbuh mikroba rizosfer seperti

Rhizobium sp. yang mampu menghasilkan fitohormon asam indol asetat (IAA).

Prana (1997) mengemukakan bahwa terdapat kelompok *Rhizobium* sp. potensial penghasil IAA. Yao *et al.* (2008) melaporkan bahwa sejumlah isolat *Rhizobium* sp. yang dikoleksi di China Barat Laut mampu menghasilkan IAA sebesar 0,2-5,1 mg/mL dan isolat terbaik mampu meningkatkan pertumbuhan perakaran dan batang gandum dan oat. Pemanfaatan limbah lateks untuk produksi IAA akan memiliki keuntungan ganda, yaitu meningkatkan nilai tambah limbah, mengurangi pencemaran dan menekan biaya pengolahan limbah serta menyediakan pupuk biorganik.

Prekursor utama biosintesis IAA oleh *Rhizobium* adalah L-triptofan (Trp) dan biosintesisnya dapat berlangsung melalui tiga macam jalur yaitu indol-3-asetamida, triptamin atau indol-3-asam piruvat (Patten & Glick, 1996; Thenius *et al.*, 2004). Menurut Arkhipchenko *et al.* (2006) di dalam tanah dan eksudat akar tanaman terdapat Trp dalam konsentrasi kecil yang dapat digunakan mikroorganisme membentuk auksin tersebut. Oleh karena itu penambahan Trp eksogen dapat meningkatkan biosintesis IAA dalam tanah (Ahmad *et al.*, 2005). Salah satu sumber Trp eksogen yang potensial dan murah adalah pupuk kandang dari kotoran ayam karena hewan tersebut menunjukkan tingkat asimilasi Trp yang rendah (Arkhipchenko *et al.*, 2006). Penelitian bertujuan menetapkan kemampuan *Rhizobium* sp. menghasilkan IAA dalam medium sintetik dan serum lateks yang ditambah Trp murni dan dari kotoran ayam sebagai sumber Trp murah.

Bahan dan Metode

Rhizobium sp. dan medium fermentasi

Rhizobium sp. R6 dan *Rhizobium sp.* KT yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat asli Indonesia koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia. Isolat KT diisolasi dari bintil kacang tanah di Bogor sedangkan isolat R6 dari bintil *Calopogonium caeruleum* asal Sumatera Utara. Isolat dipelihara pada agar miring *Yeast Extract Mannitol* (YEM) dengan komposisi K₂HPO₄ 0,5 g; MgSO₄.7H₂O 0,2 g; NaCl 0,1 g; manitol 10 g; *yeast extract* 1 g; agar 20 g; akuades 1.000 mL. Medium fermentasi berupa YEM atau serum lateks yang disuplementasi dengan Trp 0,07 g/L dan 0,14 g/L. Serum lateks adalah hasil penggumpalan spontan lateks skim yang diperoleh dari Kebun Cikumpay PTP Nusantara VIII, Jawa Barat. Serbuk pupuk kandang kotoran ayam diperoleh dari peternakan ayam pedaging di Bogor.

Persiapan inokulum

Kultur *Rhizobium sp.* dalam agar miring YEM umur 5-6 hari disuspensikan dengan 5 mL aquades steril dan diinokulasikan dalam medium cair YEM (25 mL). Kultur diinkubasikan pada suhu ruang (27-30°C), digoyang dengan *shaker* pada kecepatan 75 rpm selama dua hari hingga diperoleh kepadatan populasi sekitar 2-5 x 10¹⁰ koloni/mL. Kultur tersebut selanjutnya digunakan sebagai sumber inokulum yaitu sebanyak 5% (v/v) dari medium fermentasi.

Produksi IAA dalam medium sintetik

Pertumbuhan dan produksi IAA oleh *Rhizobium sp.* R6 dan KT diuji dalam medium fermentasi YEM (100 mL). Medium diinokulasi dengan suspensi bakteri (5 mL), diinkubasikan pada suhu ruang (27-30°C) sambil diguncang dengan *shaker* pada kecepatan 75 rpm selama 120 jam. Percobaan dilakukan dengan tiga ulangan. Kultur lalu diamati pertumbuhannya dengan mengukur densitas optik pada panjang gelombang 660 nm pada interval waktu 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 jam. Pada saat bersamaan, produksi IAA dari kultur tersebut diperiksa. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit kemudian dipisahkan kultur filtratnya. Penetapan IAA dilakukan dengan reagen Salkowski (Fletcher & Saul, 1963). Kultur filtrat bakteri (1 mL) ditambahkan 4 mL reagen Salkowski. Selanjutnya divorteks dan didiamkan pada suhu ruang selama 20 menit untuk pengembangan warna. Pengukuran IAA dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm dan dihitung dengan larutan standar IAA murni.

Produksi IAA dalam medium serum lateks dengan suplementasi Trp murni

Pertumbuhan dan produksi IAA oleh *Rhizobium sp.* R6 diuji dalam medium serum lateks (100 mL) yang disubstitusi 0, 10, 25, dan 50% (v/v) dengan medium sintetik YEM. Untuk mengantisipasi kemungkinan kerusakan dan pencokelatan medium karena panas selama sterilisasi dengan autoklaf (121°C, 1,2 kg/cm²)

selama 15 menit, medium serum lateks juga disterilisasi dengan cara pasteurisasi (90°C selama 30 menit) dan bahan kimia Clorox (NaOCl) 5 dan 25 ppm. Untuk menghilangkan sisa ion klorin medium diaerasi dengan udara steril selama satu jam. Kultur lalu diamati pertumbuhannya pada suhu ruang dan dengan pengocokan menggunakan *shaker* kecepatan 75 rpm. Pertumbuhan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm pada interval waktu inkubasi 0, 24, 48, 72 jam. Produksi IAA diamati seperti percobaan dalam medium sintetik.

Produksi IAA dalam medium serum lateks dengan suplementasi kotoran ayam

Kotoran ayam yang digunakan (180 g) diasumsikan mengandung sekitar 460 µg/g Trp (Arkhipchenko *et al.*, 2006), diekstraksi dingin dengan serum lateks pekat (600 mL) sampai mencapai tingkat batas kelarutan penuh, sehingga diperoleh Trp mendekati 0,14 g/L. Untuk memperoleh Trp 0,07 g/L kotoran ayam diekstraksi separuh dari batas kelarutan penuh. Medium diinokulasi dengan kultur *Rhizobium* sp. R6 sebanyak 5% inokulum. Untuk menghilangkan kekeruhan filtrat kultur yang berasal dari kotoran ayam, filtrat ditambah dengan larutan *trichloro acetic acid* (TCA) 5% 1:1 (v/v), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Filtrat jernih digunakan untuk analisis kadar IAA. Kultur diinkubasikan pada suhu ruang dengan pengocokan menggunakan *shaker* kecepatan 75 rpm. Pengamatan dilakukan dalam interval 0, 24, 48, dan 72 jam.

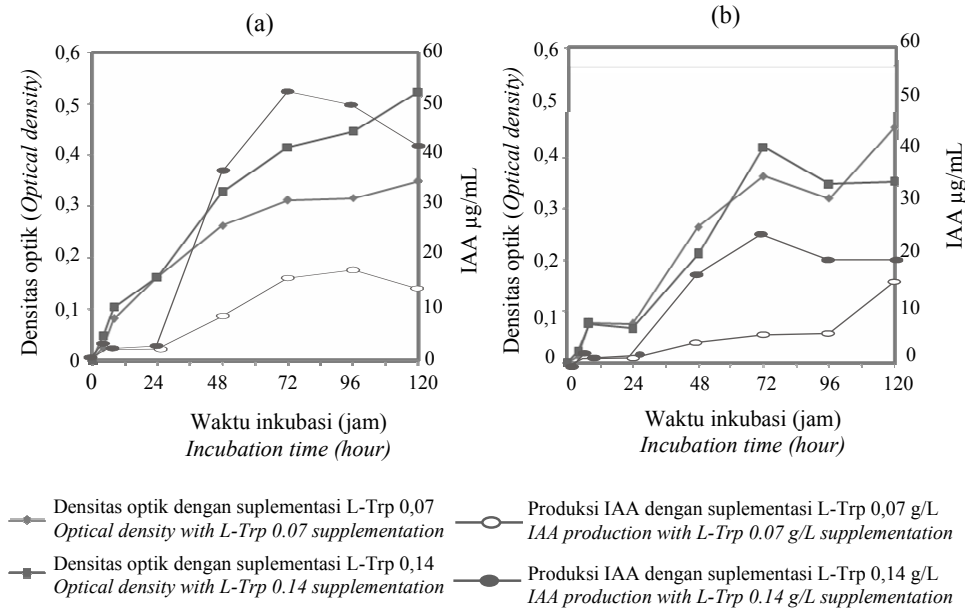
Hasil dan Pembahasan

Uji pertumbuhan dan produksi IAA dalam medium sintetik

Secara umum, peningkatan jumlah Trp mampu meningkatkan pertumbuhan *Rhizobium* sp. (Gambar 1a & 1b) karena Trp merupakan sumber nitrogen yang mudah diserap oleh mikroorganisme. Triptofan juga dapat digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi yang akan diurai menjadi senyawa yang masuk dalam beberapa jalur metabolisme karbohidrat (Moat & John, 1995). *Rhizobium* sp. R6 tumbuh lebih cepat dibandingkan *Rhizobium* sp. KT. Setelah inkubasi 120 jam, pertumbuhan *Rhizobium* sp. R6 masih menunjukkan kecenderungan meningkat (data tidak disertakan). Densitas optik tertinggi untuk *Rhizobium* sp. R6 0,523 dicapai pada inkubasi selama 120 jam (Trp 0,14 g/L) sedangkan untuk *Rhizobium* sp. KT yaitu 0,457 pada inkubasi selama 72 jam (Trp 0,14 g/L).

Produksi IAA (Gambar 1a & 1b) cenderung meningkat sejalan dengan pertumbuhan sel *Rhizobium* sp. Produksi IAA mulai tampak pada fase lag dengan konsentrasi yang kecil dan mencapai puncak pada inkubasi selama 72-96 jam pada isolat R6 dengan suplementasi Trp 0,14 g/L dan 0,07 g/L dan 96 jam pada isolat KT dengan suplementasi Trp 0,14 g/L. Produksi IAA pada isolat KT dengan suplementasi 0,07 g/L sampai dengan inkubasi selama 96 jam masih belum mencapai puncak. Spaepen *et al.* (2007) mengemukakan bahwa produksi tertinggi IAA dicapai pada akhir fase

Produksi IAA oleh *Rhizobium sp.* dalam medium sintetik dan.....



Gambar 1. Pertumbuhan dan produksi IAA oleh (a) *Rhizobium sp.* R6 dan (b) *Rhizobium sp.* KT pada medium YEM + Trp 0,07 g/L dan 0,14 g/L.

Figure 1. The growth and IAA production by (a) *Rhizobium sp.* R6 and (b) *Rhizobium sp.* KT on YEM medium + Trp 0.07 g/L dan 0.14 g/L.

logaritmik dan awal fase stasioner. Pada fase tersebut, bakteri akan beradaptasi dengan cekaman lingkungan medium berupa berkurangnya jumlah karbon dan pH medium yang semakin asam sehingga pertumbuhan bakteri terhambat. Kondisi tersebut mengaktifkan gen-gen tertentu untuk mengkatalisis senyawa intermediet potensial menjadi IAA. Penambahan prekursor Trp yang lebih tinggi meningkatkan pertumbuhan dan produksi IAA. Suplementasi Trp 0,14 g/L menghasilkan IAA yang lebih tinggi dibandingkan dengan suplementasi Trp 0,07 g/L. Hal ini terlihat dari laju pertumbuhan dan pro-

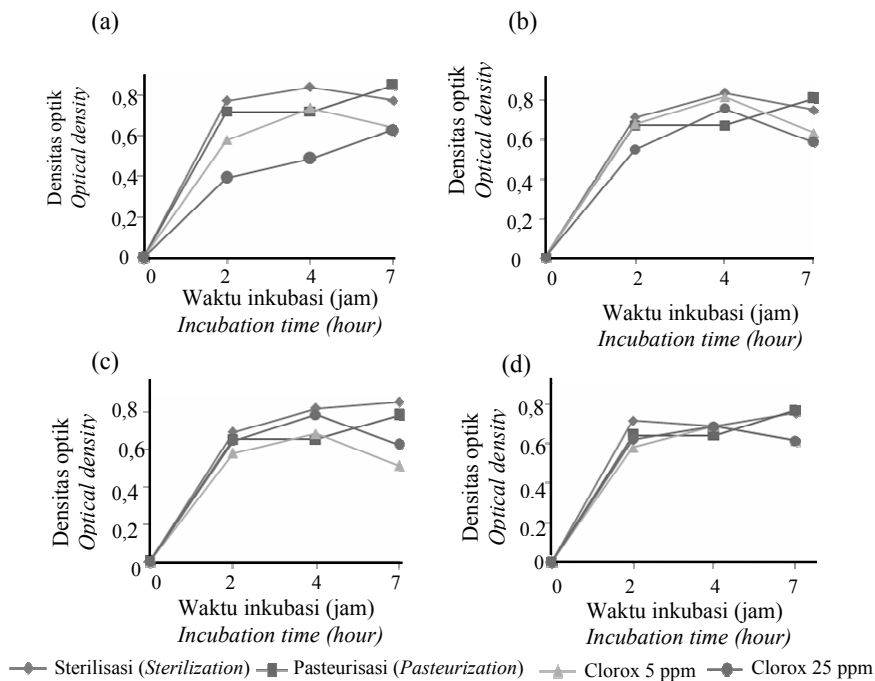
duksi IAA yang tinggi pada *Rhizobium sp.* R6. *Rhizobium sp.* R6 menghasilkan IAA yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Rhizobium sp.* KT. Secara keseluruhan kisaran konsentrasi IAA yang dihasilkan dengan suplementasi Trp 0,07 g/L adalah 1,36-16,88 µg/mL sedangkan suplementasi Trp 0,14 g/L adalah 2,63-51,08 µg/mL. Perbedaan kemampuan produksi IAA antara isolat R6 dan KT mungkin disebabkan oleh asal isolat. Isolat R6 menghasilkan IAA lebih tinggi (51,08 µg/mL) dibandingkan dengan *Rhizobium sp.* yang diisolasi oleh Basu & Ghosh (2001) dari bintil akar *Roystonea*

regia yaitu menghasilkan IAA tertinggi 45,6 µg/mL pada medium basal yang mengandung 3 g/L Trp. Isolat R6 selanjutnya dipilih untuk percobaan produksi IAA dengan medium fermentasi berupa serum lateks pekat + YEM dan berbagai cara sterilisasi.

Uji pertumbuhan dan produksi IAA dalam medium serum lateks

Rhizobium sp. R6 tumbuh baik pada medium serum lateks dengan perlakuan

sterilisasi menggunakan autoklaf dan perlakuan pasteurisasi (Gambar 2), sedangkan disinfeksi menggunakan clorox 5 dan 25 ppm menyebabkan pertumbuhannya tertekan karena kemungkinan di dalam medium masih terdapat sisa ion Cl⁻ yang toksik. *Rhizobium* sp. R6 tumbuh baik dalam medium 100% lateks pekat baik yang disterilisasi maupun dipasteurisasi. Serum lateks yang disterilisasi dengan autoklaf tidak mengalami pencoklatan (*browning*). Hal ini kemungkinan disebabkan limbah lateks



Gambar 2. Pertumbuhan *Rhizobium* sp. R6 dalam medium a) serum lateks 100% + Trp 0,14 g/L ; b) serum lateks 90 % + YEM 10% ; c) serum lateks 75 % + YEM 25 % ; d) serum lateks 50 % + YEM 50 %

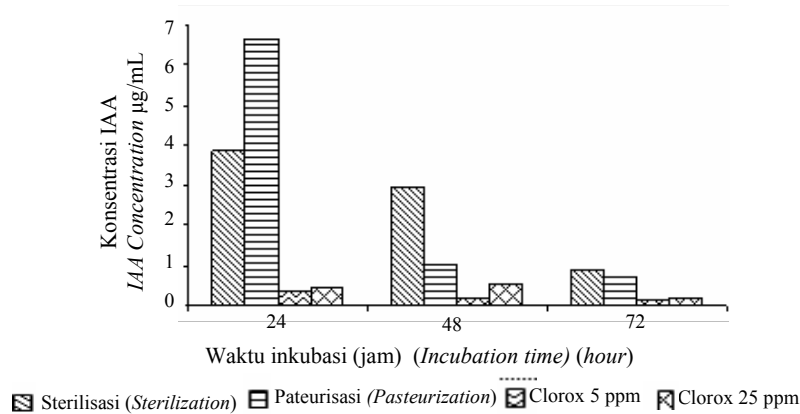
Figure 2. Growth of *Rhizobium* sp. R6 in media a) latex serum 100% + Trp 0.14 g/L ; b) latex serum 90 % + YEM 10% ; c) latex serum 75 % + YEM 25 % ; d) latex serum 50 % + YEM 50 %.

Produksi IAA oleh Rhizobium sp. dalam medium sintetik dan.....

yang digunakan adalah limbah lateks yang menggumpal alami dan tidak digumpalkan dengan asam sulfat. Hal ini berarti dalam medium serum lateks cukup tersedia nutrisi dan pH yang sesuai untuk menunjang pertumbuhan *Rhizobium sp.*

Rhizobium sp. R6 mampu memproduksi IAA dalam medium serum lateks 100%. Secara umum, produksi IAA oleh *Rhizobium sp.* R6 lebih tinggi dalam medium serum lateks pekat yang disterilisasi dan dipasteurisasi dibandingkan dengan disinfeksi dengan pemberian clorox 5 dan 25 ppm (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan laju pertumbuhan *Rhizobium sp.* R6 pada medium serum lateks. Dalam medium serum lateks + clorox 5 dan 25 ppm, *Rhizobium sp.* R6

tidak dapat tumbuh dengan optimal, yang mungkin disebabkan dalam medium serum lateks masih mengandung residu ion Cl⁻ yang toksik sehingga biosintesis IAA juga terhambat. Produksi IAA tertinggi dicapai pada jam ke 24 dalam medium 100 % serum lateks + Trp 0,14 g/L dengan perlakuan pasteurisasi (6,63 µg/mL) dan sterilisasi (3,83 µg/mL). Produksi IAA masih terdeteksi selama 72 jam inkubasi. Produksi IAA lebih stabil dengan perlakuan sterilisasi daripada pasteurisasi. Hal ini dapat disebabkan karena pasteurisasi hanya mematikan sel vegetatif bakteri sehingga spora bakteri lain masih bisa tumbuh dan kemungkinan dapat mengganggu pertumbuhan *Rhizobium sp.* R6.



Gambar 3. Produksi IAA oleh *Rhizobium sp.* R6 yang ditumbuhkan dalam medium serum lateks pekat dengan beberapa perlakuan sterilisasi

Figure 3. The IAA production by *Rhizobium sp.* R6 in latex serum medium with several sterilization treatments

Produksi IAA dalam medium serum lateks dengan suplementasi Trp kotoran ayam

Rhizobium sp. R6 mampu menghasilkan IAA dalam medium serum lateks 100% yang disuplementasi kotoran ayam (Tabel 1). Namun produksi IAA dalam medium sintetik + Trp murni lebih tinggi dari pada dalam medium lateks pekat + kotoran ayam. Hal tersebut karena medium sintetik memiliki komposisi nutrisi yang lebih kaya dan dalam bentuk tersedia sehingga menunjang pertumbuhan dan produksi IAA. *Rhizobium* sp. R6

memproduksi IAA tertinggi pada inkubasi selama 48 jam yaitu mencapai 11,91 µg/mL.

Secara umum, produksi IAA dalam medium serum lateks yang disuplementasi kotoran ayam sebagai sumber Trp pada batas kelarutan penuh (F) lebih tinggi dibandingkan dengan suplementasi kotoran ayam setengah batas kelarutan (1/2F). Hal ini dapat dimengerti karena penambahan Trp ke dalam medium akan mempertinggi produksi IAA. Kotoran ayam terbukti dapat digunakan sebagai sumber Trp dan dapat menggantikan

Tabel 1. Produksi IAA oleh *Rhizobium* sp. R6 dalam medium serum lateks dengan suplementasi Trp dari kotoran ayam.

Table 1. The IAA production of *Rhizobium* sp. R6 on latex serum medium with Trp supplementation from litter poultry manure.

Lama inkubasi jam ke- <i>Incubation period hour</i>	Medium lateks yang disuplementasi dengan <i>Latex medium supplemented with</i>	Produksi IAA <i>IAA production</i> (µg/mL)
0	PK (F)	0,00
	PK (1/2 F)	0,00
3	PK (F)	5,47 ± 1,11
	PK (1/2 F)	2,78 ± 0,28
6	PK (F)	9,94 ± 2,73
	PK (1/2 F)	7,29 ± 1,08
24	PK (F)	9,92 ± 0,84
	PK (1/2 F)	7,42 ± 0,40
48	PK (F)	11,91 ± 1,11
	PK (1/2 F)	4,34 ± 0,93
72	PK (F)	7,77 ± 0,15
	PK (1/2 F)	7,05 ± 1,92
96	PK (F)	5,61 ± 0,31
	PK (1/2 F)	1,49 ± 1,73
72	Trp 0,14 g/L	1,51 ± 0,88

Keterangan/Note:

PK : kotoran ayam (*litter poultry manure*)

F : batas kelarutan penuh (*absolute solubility limit*)

½ F : setengah batas kelarutan penuh (*half solubility limit*)

Trp sintetik untuk produksi IAA. Produksi IAA dalam medium serum lateks yang disuplementasi dengan kotoran ayam lebih tinggi nilainya dibandingkan dengan produksi IAA dalam medium serum lateks + Trp 0,14 g/L yaitu 1,51 µg/mL. Hal tersebut kemungkinan dalam kotoran ayam terdapat sisa nutrisi dari makanan ayam yang dapat membantu pertumbuhan. Kandungan IAA yang diproduksi oleh bakteri tanah dalam jumlah berlebihan dapat menghambat pertumbuhan paprika (*Capsicum annuum*) (Husin & Saraswati, 2003). Namun, IAA yang dihasilkan oleh *Rhizobium meliloti* dalam tanah dapat rusak oleh aktivitas mikroba (Mino *et al.*, 1975). Produksi IAA oleh *Rhizobium* merupakan fungsi tambahan pada formula pupuk hayati untuk tanaman leguminosa. Oleh karena itu aplikasi IAA dalam formula pupuk hayati dengan bahan aktif *Rhizobium* sp. perlu diuji pada tanaman leguminosa penutup tanah maupun leguminosa yang lain di lapang pada berbagai lokasi.

Prospek produksi IAA dengan menggunakan limbah lateks pekat cukup baik mengingat ketersediaan bahan baku yang melimpah, yaitu sebanding dengan produksi lateks pekat dan pemanfaatannya dapat langsung di kebun yang bersangkutan sehingga biaya transportasi relatif murah.

Kesimpulan

Rhizobium sp. R6 memiliki kemampuan yang tinggi (51,08 µg/mL) dalam memproduksi IAA pada medium sintetik cair dengan penambahan Trp murni selama 72 jam. Isolat tersebut juga mampu menghasilkan IAA pada medium

serum lateks 100% yang disuplementasi kotoran ayam sebagai sumber Trp yang murah yaitu mencapai 11,91 µg/mL selama 48 jam.

Daftar Pustaka

- Ahmad F, I.Ahmad, & M.S. Khan (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29, 29-34.
- Arkhipchenko, A, A.I. Shaposhnikov & L.V. Kravchenko (2006). Tryptophan concentration of animal wastes and organic fertilizer. *Appl. Soil Ecology*, 34 (1), 62-64. www.sciencedirect.com
- Basu, P.S. & A.C. Ghosh (2001). Production of indole acetic acid in culture by a *Rhizobium* species from the root nodules of a monocotyledonous tree, *Roystonea regia*. *Acta Biotechnol.*, 21 (1), 65 – 72.
- Darussamin, A., Suharyanto, A. M. Siregar & R. Haloho (1988). Penggunaan bakteri untuk menangani limbah pabrik lateks pekat. *Dalam; Pros. Sem. Nas. Pengendalian Limbah Minyak Sawit dan Karet* 1988, p. 92-106.
- Fletcher R. A. & Z. Saul (1963). Quantitative spectrophotometric determination of indolyl-3-acetic acid. *Nature*, 199, 903 – 904.
- Husin, E & R. Saraswaati (2003). Effect of IAA-producing bacteria on the growth of hot pepper. *J. Mikrobiol. Ind.*, 8 (1), 22-26.
- Jacob, J.L., J.d'Auzac & J.C. Prevot (1993). The composition of natural latex *Hevea brasiliensis*. *Clin. Rev. Allergy*, 11, 325-337.

- Mino, Y., N. Iriuda & T. Harada (1975). Tryptophan and indole-3-acetic acid metabolism by *Rhizobium meliloti*. *J. Japan Grassi. Sci.*, **21**(2), 86-90.
- Moat, A.G & W.F John (1995). *Microbial Physiology*. Third Ed. New York, John Wiley & Sons p, 305-306, 452-453.
- Prana, T.K (1997). Presuppotion of genotype grouping of *Rhizobium* associated with two tropical leguminous trees based on their IAA production & antibiotic resistance. *Annales Bogorienses*, **5** (1), 39-41.
- Patten, C.L. & B. R. Glick (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J. Microbiol.*, **42**, 207-220.
- Spaepen S, Venderleyden J. & Remans R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**(4), 425-448.
- Thenius, M., H. Kobayashi, W. J. Broughton & E. Prinsen (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod-Box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, **17** (10), 1153-1161.
- Tri-Panji, S.S. Achmadi & E. Tjahjadarmawan (1996). Produksi asam γ -linolenat dari ganggang mikro *Spirulina platensis* menggunakan limbah lateks pekat. *Menara Perkebunan*, **64** (1), 64-44.
- Tri-Panji & Suharyanto (2000). Optimization media from low-cost nutrient sources for growing *Spirulina platensis* and carotenoid production. *Menara Perkebunan*, **68** (1), 64-44.
- Yao, T., S. Yasmin & F.Y. Hafeez (2008). Potential role of rhizobacteria isolated from Northwestern China. *J. Agric. Sci.* **146**, 49-56