

KERAGAMAN BAKTERI ENDOFIT PADA TANAMAN *Curcuma heyneana* DAN POTENSINYA DALAM MENAMBAT NITROGEN

DIVERSITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH Curcuma heyneana AND THEIR POTENCY FOR NITROGEN FIXATION

Tri Ratna Sulistiyani^{1*} dan Puspita Lisdiyanti²

¹Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Indonesia.

²Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Indonesia.

*E-mail: tri_ratna83@yahoo.com

ARTICLE INFO

Article history

Received date:

31 March 2016

Received in revised form date:

2 May 2016

Accepted date:

8 August 2016

Available online date:

30 November 2016

Abstract

Endophytic bacteria shows a high biodiversity and some of the species plays an important biological roles in agriculture. The aim of this study was to investigate the endophytic bacteria diversity associated with temu giring (*Curcuma heyneana*) and to evaluate its nitrogen-fixation activity. Temu giring was collected from Bogor Botanic Garden. The isolation of endophytic bacteria was carried out using two methods (spread plate and plant piece methods) and four different medias (Nutrient Agar (NA), NA contained temu giring extract (NAH), Water Yeast Extract Agar (WYEA), and WYEA contained temu giring extract (WYEAH)). The identification of selected isolates were conducted based on 16S rDNA. The ability of selected isolates to fix the nitrogen on Jensen's media is then being tested. The results revealed that the suitable method and media of endophytic bacteria isolation were spread plate method and NA. Based on the morphological characteristics differentiation, 30 isolates were obtained from rhizome (27%), stem (50%), and leaves (23%). The sequencing result of 16S rDNA showed that community of endophytic bacteria was divided into six clusters, those are *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteriia*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes* which represented 17 genus consisted of *Microbacterium*, *Leclercia*, *Brevundimonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Novosphingobium*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Mycobacterium*, *Starkeya*, and *Rhizobium*. A total of eleven isolates could grow in the N free medium. The presence of endophytic bacteria those were able to fix nitrogen are expected to be applied in agricultural sector as a biological fertilizer.

Keywords: *Curcuma heyneana*, Endophytic bacteria, Population diversity, Nitrogen-fixing activity

Kata kunci:

Curcuma heyneana
Bakteri endofit
Keragaman populasi
Fiksasi nitrogen

Abstrak

Bakteri endofit memiliki keragaman tinggi dan beberapa jenisnya memainkan peran biologi penting dalam bidang pertanian. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji keragaman bakteri endofit di tanaman temu giring (*Curcuma heyneana*) dan mengetahui aktivitasnya dalam memfiksasi nitrogen. Tanaman temu giring dikoleksi dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor. Isolasi bakteri endofit menggunakan dua metode (metode cawan sebar dan potongan tanaman) dan empat macam media, yaitu *Nutrient Agar* (NA), NA dengan ekstrak temu giring (NAH), *Water Yeast Extract Agar* (WYEA), WYEA dengan ekstrak temu giring (WYEAH). Identifikasi isolat terseleksi dilakukan berdasarkan 16S rDNA. Isolat terseleksi selanjutnya diuji kemampuannya dalam memfiksasi nitrogen pada media *Jensen's*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode dan media isolasi bakteri endofit yang paling sesuai digunakan adalah metode cawan sebar dan media NA. Berdasarkan perbedaan karakteristik morfologi diperoleh 30 isolat bakteri endofit dari bagian rimpang (27%), batang (50%), dan daun (23%). Hasil *sequencing* 16S rDNA menunjukkan bahwa komunitas bakteri endofit pada tanaman temu giring terdiri dari enam kelompok kluster, yaitu *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteri*, *Actinobacteria*, dan *Firmicutes* yang merepresentasikan 17 genus, di antaranya *Microbacterium*, *Leclercia*, *Brevundimonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Novosphingobium*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Mycobacterium*, *Starkeya*, dan *Rhizobium*. Sebanyak sebelas isolat mampu tumbuh pada media bebas. Dengan adanya bakteri endofit yang mampu menambat nitrogen, diharapkan bakteri tersebut dapat diaplikasikan dalam bidang pertanian sebagai pupuk hayati.

© 2016 Widyariset. All rights reserved

PENDAHULUAN

Bakteri endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme yang hidup mengkolonisasi bagian dalam tanaman dan dapat tinggal untuk seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit bagi inangnya (Chebotar *et al.* 2015). Endofit ini dapat dideteksi setelah mengalami proses sterilisasi permukaan. Ratusan spesies bakteri endofit dapat diisolasi dari satu jenis tanaman (Tan and Zou 2001) dan kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman inang, jenis tanaman, dan umur tanaman akan berpengaruh terhadap populasi dan profil dari mikroba endofit di dalamnya (Tan and Zou 2001; Mano & Morisaki, 2008; Ruby 2011). Be-

berapa bakteri endofit tersebut merupakan bakteri yang potensial dalam bidang kesehatan (Joseph and Priya 2011; Strobel and Daisy 2003) dan pertanian (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006). Bakteri endofit dalam bidang pertanian, banyak digunakan sebagai penghasil hormon pemacu pertumbuhan tanaman, biofertilizer, biokontrol, pelarut fosfat, dan juga mampu menambat nitrogen (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006).

Nitrogen merupakan nutrisi yang sangat penting bagi pertumbuhan tanaman. Bakteri endofit dalam bidang pertanian banyak digunakan sebagai penghasil hormon, pemacu pertumbuhan tanaman, biofertilizer, biokontrol, pelarut fosfat, dan

juga mampu menambat nitrogen. Pupuk nitrogen kimia bermanfaat untuk memenuhi kebutuhan nitrogen bagi tanaman tersebut. Penggunaan pupuk kimia yang berlebihan dan tidak beraturan dapat menyebabkan menurunnya kesuburan tanah, musnahnya mikroorganisme penyubur tanah, dan berubahnya ekosistem tanah. Pertanian dengan sedikit limbah pupuk nitrogen kimia dapat dicapai dengan pemanfaatan bakteri yang mampu menambat nitrogen. Bakteri penambat nitrogen adalah kelompok bakteri mampu mengikat nitrogen (N_2) bebas di udara dan mereduksinya menjadi senyawa amonia (NH_3) (Franche, Lindström, and Elmerich 2009). Beberapa bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman non-legume memiliki kemampuan untuk menambat nitrogen, di antaranya *Azospirillum* sp. (Okumura et al. 2013), *Klebsiella variicola* pada tanaman tebu (Wei et al. 2014), *Azoarcus* sp. dan *Herbasprillum* sp. yang diperoleh dari tanaman padi, *Klebsiella* sp. dari tanaman jagung dan gandum (Santi, Bogusz, and Franche 2013).

Keragaman bakteri endofit pada tanaman obat sangat tinggi. Sebanyak 23 genus bakteri berhasil diidentifikasi dari kelompok *Zingiberaceae* (*Curcuma zedoaria*) yang dikoleksi dari Bogor (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014). Sebanyak 31 isolat bakteri endofit yang diperoleh dari tanaman jahe terdiri dari 17 genus berbeda (Chen et al. 2014). Miller et al. (2012) melaporkan bahwa dari delapan spesies tanaman obat tradisional di Cina diperoleh 73 bakteri endofit termasuk dalam 14 genus berbeda. Tanaman *Zingiberaceae* lainnya yang menarik untuk dikaji keragamannya adalah *Curcuma heyneana* (temu giring). Secara tradisional tanaman temu giring memiliki manfaat beragam, tetapi kurang populer dan dimanfaatkan oleh masyarakat. Secara ilmiah ekstrak rimpang temu giring memiliki aktivitas antibakteri

(Diastuti et al. 2014), anti inflamasi (Cho et al. 2009), dan inhibitor α -glukosidase (Hasimun et al. 2016). Kaum wanita dapat memanfaatkan tanaman ini untuk menghambat proses penuaan, menjaga kelangsingan tubuh, dan menjaga kecantikan kulit (Riyanto 2010). Bakteri endofit dari suatu tanaman obat tidak hanya mencerminkan profil dari tanaman inangnya tersebut. Beberapa bakteri endofit dari tanaman obat dapat diaplikasikan di bidang pertanian, contohnya bakteri penambat nitrogen. Bakteri ini diharapkan dapat diaplikasikan dalam bidang pertanian, sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman inang dan produksi hasil tanaman.

Penelitian bertujuan untuk mengkaji keragaman bakteri endofit pada tanaman temu giring dan mengetahui potensinya dalam menambat nitrogen melalui kemampuannya tumbuh pada media bebas nitrogen.

METODE PENELITIAN

Sampel Tanaman

Tanaman *Curcuma heyneana* sehat diambil dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, Bogor, Jawa Barat, Indonesia pada posisi S 06°35.640' E 106°48.102' dengan elevasi 279 m dpl. Sampel diambil pada bulan Februari 2013 dan terdiri atas tiga tanaman dari tiga titik yang berbeda. Tanaman selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.

Sterilisasi Permukaan Jaringan Tanaman Temu Giring

Tanaman diambil dari lokasi lapangan dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir selama 5–10 menit. Bagian tanaman dipisahkan antara rimpang, batang

dan daun, selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan. Masing-masing bagian tanaman dipotong-potong menjadi ukuran 2x2 cm dan direndam dalam larutan etanol 70% selama tiga menit. Potongan tanaman direndam kembali dengan larutan natrium hipoklorit 3% selama lima menit, dibilas dengan etanol 70% selama 30 detik, dan dilanjutkan dengan akuades steril selama dua menit. Pencucian dengan akuades steril diulang selama tiga kali. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan kertas tisu steril. Sebanyak 100 µL akuades hasil pencucian terakhir disebar pada permukaan media. Media yang digunakan adalah NA, NA dengan 2% ekstrak tanaman temu giring (NAH), WYEA, WYEA dengan 2% ekstrak tanaman temu giring (WYEAH). Masing-masing media ditambah sikloheksamida 50 µg/mL untuk menghambat pertumbuhan cendawan (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014).

Isolasi Bakteri Endofit

Bakteri endofit diisolasi menggunakan metode cawan sebar dan metode potongan tanaman. Sampel yang sudah disterilisasi permukaannya dipotong menjadi potongan-potongan kecil (4–6 mm²). Isolasi menggunakan metode cawan sebar, potongan sampel steril dihaluskan terlebih dahulu menggunakan mortar steril. Sebanyak 1 g sampel dimasukkan ke tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril dan dilakukan pengenceran berseri. Sebanyak 100 µL dari pengenceran 10⁻¹ dan 10⁻² disebar di atas permukaan media agar cawan, kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 2–15 hari. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dan data populasi ditransformasikan dalam nilai log (cfu/g sampel). Isolasi dengan metode potongan tanaman, potongan sampel steril yang berukuran 4-6 mm² diletakkan di atas permukaan media agar dalam cawan petri, selanjutnya cawan petri diinkubasi pada

suhu 28 °C selama 2–15 hari (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014).

Bakteri dengan karakteristik morfologi berbeda diisolasi, dimurnikan, dan dipilih untuk diidentifikasi secara molekuler. Pengamatan karakteristik morfologi berupa warna, tepian, permukaan dan penentuan sifat Gram dilakukan dengan menggunakan uji KOH (Powers 1995).

Pemurnian dan Penyimpanan Bakteri Endofit dari Tanaman Temu Giring

Bakteri endofit yang telah diisolasi selanjutnya dimurnikan pada media NA dengan metode kuadran. Pemurnian dilakukan beberapa kali hingga diperoleh koloni murni. Bakteri endofit selain di simpan dalam media NA miring sebagai biakan kerja, juga disimpan dalam bentuk gliserol dengan konsentrasi akhir 10% dan disimpan dalam suhu –80 °C.

Ekstraksi DNA, Amplifikasi PCR, dan Elektroforesis

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Packeiser et al. (2013). Sel dari koloni tunggal pada permukaan media padat diambil dengan menggunakan tusuk gigi steril dan disuspensikan ke dalam 20 µL air bebas nuklease. Suspensi kemudian divortex selama sepuluh detik dan diinkubasi pada suhu 98 °C selama lima menit. Supernatan dipisahkan dari endapan dengan sentrifugasi untuk selanjutnya supernatan digunakan sebagai cetakan DNA.

DNA diamplifikasi menggunakan *GoTaq* (Promega) dengan sepasang primer universal 27F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Palaniappan et al. 2010). Setiap tabung berisi *Ultrapure water* 9,75 µL, *GoTaq Green MasterMix* 2x 12,5 µL, primer 27F (10 µM) 0,625 µL, primer 1492R

(10 μ M) 0,625 μ L, DMSO 0,5 μ L, dan 1 μ L sampel DNA dengan total volume 25 μ L. Amplifikasi dilakukan dengan kondisi PCR: predenaturasi 95 °C selama 90 detik, dilanjutkan 30 siklus terdiri atas denaturasi (95 °C, 30 detik), *annealing* (50 °C, 30 detik), *elongation* (72 °C, 90 detik), dan *final extension* pada 72 °C selama lima menit, dilanjutkan 4 °C selama 20 menit. Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 1%. Setelah selesai, gel diendam dalam larutan etidium bromida 5 μ g/mL selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan menggunakan alat UV *transilluminator*.

Sekuensing 16S rDNA dan Analisis Bioinformatika

Hasil amplifikasi PCR di-*sekuensing* di Laboratorium Macrogen Korea dengan menggunakan ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer Applied Biosystems*. Data hasil *sekuensing* diolah dengan program Bioedit. Homologi sekuen 16S rDNA dicari dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (BLASTN) (McGinnis and Madden 2004). Sekuen referensi diperoleh dari bank data GeneBank/DDBJ/EMBL yang diakses secara *online* melalui internet www.ncbi.nlm.nih.gov pada tanggal 30 Desember 2015. Pohon filogenetik dibuat dengan metode *neighbor-joining* (Saitou and Nei 1987) yang terimplementasi dalam program MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) dan 1000x ulangan *bootstrap*.

Kemampuan Tumbuh pada Media Bebas Nitrogen

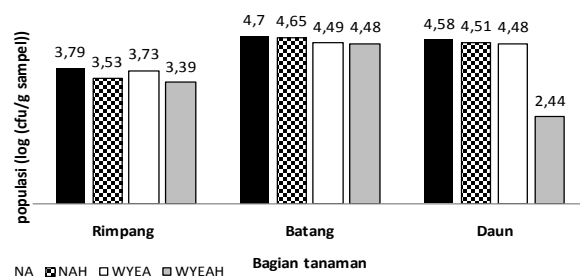
Uji kemampuan bakteri endofit dalam memfiksasi nitrogen dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media bebas N, yaitu media *Jensen's* dengan komposisi 20 g sukrosa, 1 g K_2HPO_4 , 0,500 g $MgSO_4$,

0,500 NaCl, 0,100 g Fe_2SO_4 , 0,005 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2,000 g $CaCO_3$, dan 15,000 g agar, per 1 L media. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C selama delapan hari. Pertumbuhan bakteri endofit diamati pada hari ke-8 (Ahmad, Ahmad, and Khan 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kelimpahan Bakteri Endofit yang Dapat Dikulturkan dari Tanaman *C. heyneana*

Berdasarkan data pada Gambar 1, secara keseluruhan kelimpahan bakteri endofit berbeda pada tiap-tiap bagian tanaman, yaitu berkisar dari 2 sampai 4 log (cfu/g sampel). Populasi terendah diperoleh dari sampel bagian rimpang dan populasi tertinggi dari bagian batang. Dalal and Kulkarni (2013) melaporkan bahwa populasi mikrob endofit dari akar atau rimpang merupakan yang paling tinggi apabila dibandingkan dengan bagian lainnya karena akar merupakan tempat awal untuk mikrob memasuki tanaman. Hal senada juga dilaporkan oleh Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari (2014), bahwa populasi bakteri endofit pada tanaman kunyit putih paling tinggi ditemukan pada bagian rimpang. Data ini berbeda dengan data populasi endofit tanaman temu giring yang menunjukkan bahwa populasi endofit tertinggi terdapat pada bagian batang. Nilai populasi yang sama juga diperoleh dari tanaman kunyit putih yang diambil dari tiga lokasi yang berbeda di Bogor, yaitu



Gambar 1. Populasi bakteri endofit yang dapat dikulturkan dari tanaman temu giring

berkisar 2 sampai 4 log (cfu/g sampel) (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014).

Menurut Ruby (2011), bakteri endofit dapat ditemukan hampir pada semua bagian tanaman inang termasuk akar, batang, daun, biji, buah, umbi, dan juga dalam nodul tanaman legume. Demikian juga menurut Sulistiyani, Lisdiyanti, dan Lestari (2014) yang menemukan bakteri endofit pada semua bagian tanaman *Curcuma zedoaria*.

Proses isolasi bakteri endofit dari tanaman temu giring dilakukan dengan menggunakan dua metode dan empat jenis media berbeda. Berdasarkan metode isolasi, metode cawan sebar menunjukkan jumlah bakteri endofit lebih tinggi dibandingkan dengan metode potongan tanaman (Tabel 1). Hal ini kemungkinan dikarenakan oleh perbedaan ukuran sampel. Selain itu juga dipengaruhi oleh perbedaan proses isolasi. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode cawan sebar, sampel berukuran 4-6 mm² digerus terlebih dahulu hingga menjadi serpihan. Ketika sampel disuspensikan dalam air, bakteri yang terdapat dalam tanaman akan terdistribusi secara sempurna ke air sehingga peluang diperoleh bakteri endofit lebih banyak. Ukuran sampel pada metode potongan tanaman lebih besar sehingga peluang bakteri endofit terdistribusi pada media tumbuh lebih terbatas (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014).

Tabel 1. Jumlah bakteri endofit terseleksi yang berasosiasi dengan tanaman temu giring dengan menggunakan metode cawan sebar dan potongan tanaman

Bagian Tanaman	NA		NAH		WYEA		WYEAH	
	S	P	S	P	S	P	S	P
Rimpang	2	1	3	1	3	2	2	2
Batang	4	2	6	4	4	-	4	1
Daun	2	5	3	4	3	-	2	-
	8	8	12	9	9	2	8	3
Total	59							

Ket: S: metode cawan sebar; P: metode potongan tanaman

Tabel 1 menunjukkan bahwa bakteri endofit dapat diisolasi dengan menggunakan empat jenis media berbeda. Akan tetapi tidak semua media dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri endofit dari tanaman temu giring. Hal ini terlihat dari perbedaan perolehan jumlah bakteri endofit. Di antara empat jenis media yang digunakan, NA merupakan media paling sesuai untuk isolasi bakteri endofit. Hal ini terlihat dari kelimpahan dan keragaman bakteri endofit menjadi lebih tinggi ketika isolasi dilakukan menggunakan media NA. Hal ini dikarenakan NA merupakan media umum untuk perumbuhan bakteri, sehingga bakteri akan tumbuh lebih cepat dibandingkan media WYEA (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014).

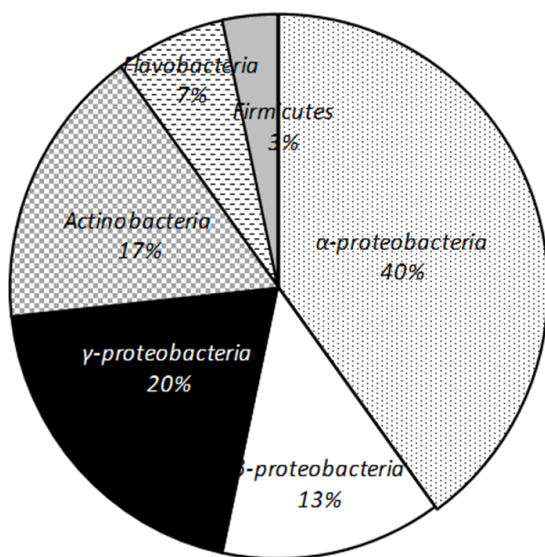
Bakteri endofit yang terisolasi dari tanaman temu giring sebanyak 59 isolat. Berdasarkan perbedaan karakteristik morfologi diperoleh 30 isolat terpilih. Sebagian besar isolat bakteri endofit berwarna krem, bentuk *irregular*, tepian *entire*, elevasi *raised*, dan *convex*, serta permukaan *shiny/opaque*. Sebanyak 30 isolat terseleksi, terdiri dari delapan isolat diisolasi dari rimpang (27%), 15 isolat dari batang (50%), dan tujuh isolat dari daun (23%). Dari isolat terseleksi tersebut, enam isolat merupakan bakteri Gram positif dan 24 isolat bakteri Gram negatif. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri endofit pada tanaman temu giring didominasi oleh bakteri Gram negatif. Bakteri endofit pada tanaman kunyit putih juga didominasi oleh bakteri Gram negatif (Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari 2014).

Analisis sekuen 16S rDNA bakteri endofit tanaman *C. heyneana*

Sekuensing 16S rDNA bakteri endofit digunakan untuk mengelompokkan isolat bakteri endofit. Hasil *sekuensing* menunjukkan bahwa komunitas bakteri

endofit pada tanaman temu giring terdiri dari 17 genus: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Leclercia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Novosphingobium*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Starkeya*, dan *Variovorax*. Sebanyak 29 isolat memiliki persen kesamaan 99% dan 100% dengan strain referensi yang terdapat di database bank data GeneBank/DDBJ/EMBL. Akan tetapi, satu isolat memiliki persen kesamaan sebesar 90%, yaitu isolat BK5 yang teridentifikasi sebagai *Brevundimonas* sp. E8 (Tabel 2). Isolat ini dapat diduga sebagai kandidat spesies baru. Erko and Ebers (2006) menyatakan jika homologi sekuen 16S rDNA dua bakteri kurang dari 98,7%, maka kedua bakteri tersebut merupakan spesies yang berbeda dan bisa dikatakan sebagai kandidat spesies baru.

Hasil pengelompokan menunjukkan isolat bakteri endofit mengelompok menjadi enam kelompok kluster yang didominasi oleh *Alphaproteobacteria* (40%), diikuti *Gammaproteobacteria* (20%),



Gambar 2. Komposisi bakteri endofit tanaman temu giring

Actinobacteria (16,67%), *Betaproteobacteria* (13,33%), *Flavobacteria* (6,67%), dan *Firmicutes* (3,33%) (Gambar 2). Sulistiyani, Lisdiyanti, dan Lestari (2014) melaporkan bahwa keragaman bakteri endofit dari tanaman kunyit putih mengelompok menjadi lima kluster dan didominasi oleh *Gammaproteobacteria*. Dari perbedaan jumlah kluster dapat disimpulkan bahwa bakteri pada tanaman temu giring lebih beragam dibandingkan dengan tanaman kunyit putih. Gambar 2 menunjukkan bahwa bakteri endofit yang terdapat pada tanaman *Curcuma* didominasi oleh bakteri kelompok *Proteobacteria*.

Jenis bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman temu giring merepresentasikan keragaman bakteri yang tinggi apabila dibandingkan dengan keragaman bakteri endofit pada tanaman kunyit putih. Keragaman tersebut kemungkinan disebabkan oleh asal sampel. Kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman akan berpengaruh terhadap populasi mikrob yang terdapat di dalamnya (Ruby 2011). Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor memiliki koleksi tanaman hidup sekitar 15.000 spesies. Semakin tinggi keragaman tanaman di suatu lokasi, semakin beragam pula mikrob yang terdapat di lokasi dalamnya (Ruby 2011).

Sulistiyani, Lisdiyanti, dan Lestari (2014) melaporkan bahwa keragaman bakteri endofit tanaman kunyit putih dari lokasi berbeda di Bogor memiliki keragaman tinggi dibandingkan dengan keragaman bakteri endofit dari penelitian lainnya. Vandan et al. (2010) berhasil mengisolasi 51 isolat bakteri endofit dari tanaman ginseng, terdiri atas sembilan genus dalam empat kelompok besar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman endofit pada tanaman *Curcuma zedoaria* dari Indonesia, khususnya Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor sangat tinggi.

Tabel 2. Tingkat kesamaan sekuen 16S rDNA bakteri endofit dari tanaman temu giring

No.	Isolat	Bagian tanaman	Identitas terdekat dengan referensi bank data	Nomor akses	Persentase kesamaan
1	DK1	D	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> strain R7-597	JQ659912	99%
2	DK2	D	<i>Sphingomonas</i> sp. G4	GU086453	99%
3	DK3	D	<i>Herbaspirillum</i> sp. ZX5	KP743007	100%
4	DK4	D	<i>Agrobacterium</i> sp. UQM 1685	KF307695	100%
5	DK5	D	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain Ph_03A5.1	KT719969	99%
6	DK6	D	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CS-30	KU522188	100%
7	DK7	D	<i>Bacillus aerophilus</i> strain MOSEL-NES16	KF307642	100%
8	BK1	B	<i>Enterobacter asburiae</i> voucher ST56	KT287073	99%
9	BK2	B	<i>Brevundimonas</i> sp. H1-28	KM979021	100%
10	BK3	B	<i>Chromobacterium aquaticum</i> strain CC-SEYA-1	NR_044405	99%
11	BK4	B	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain pca7	KP303390	99%
12	BK5	B	<i>Brevundimonas</i> sp. E8	EU784736	90%
13	BK6	B	<i>Acinetobacter soli</i> strain AT_118	KT387351	99%
14	BK7	B	<i>Microbacterium testaceum</i> strain LAP2-26	KT216572	100%
15	BK8	B	<i>Enterobacter soli</i> strain LF7	NR_117547	99%
16	BK9	B	<i>Enterobacter asburiae</i> voucher ST56	KT287073	99%
17	BK10	B	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain pca7	KP303390	99%
18	BK11	B	<i>Novosphingobium capsulatum</i> strain NBRC 12533	NR_113591	99%
19	BK12	B	<i>Chryseobacterium taiwanense</i> strain BCRC 17412	NR_043715	99%
20	BK13	B	<i>Curtobacterium plantarum</i> strain CL63	NR_104943	99%
21	BK14	B	<i>Microbacterium laevaniformans</i> strain DSM 20140	NR_044935	99%
22	BK15	B	<i>Chryseobacterium taiwanense</i> strain BCRC 17412	NR_043715	99%
23	RK1	R	<i>Variovorax paradoxus</i> strain QE5	KP686135	100%
24	RK2	R	<i>Variovorax paradoxus</i> strain QE5	KP686135	100%
25	RK3	R	<i>Mycobacterium phocaicum</i> isolate BCMUCO_06-699	EF551404	99%
26	RK4	R	<i>Starkeya</i> sp. R8-605	JQ659974	100%
27	RK5	R	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> strain R7-597	JQ659912	99%
28	RK6	R	<i>Rhizobium alarii</i> strain: VAF110B	LC106996	99%
29	RK7	R	<i>Mycobacterium phocaicum</i> isolate BCMUCO_06-699	EF551404	99%
30	RK8	R	<i>Variovorax paradoxus</i> strain QE5	KP686135	100%

Ket: D: daun, B: batang, dan R: rimpang

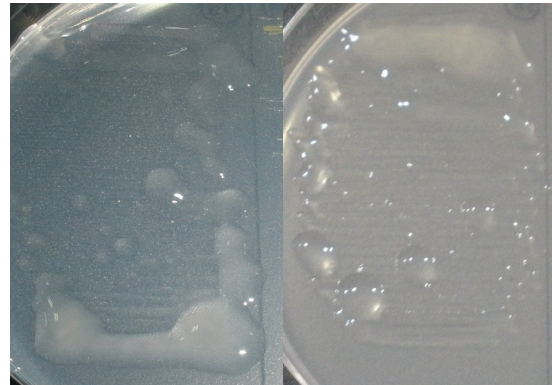
Genus yang berhasil diisolasi pada penelitian merupakan genus yang jarang ditemukan sebagai bakteri endofit. Genus yang sering teridentifikasi sebagai endofit adalah *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, dan *Enterobacter* (Miller et al. 2012). Sulistiyani, Lisdiyanti, and Lestari (2014) juga melaporkan bahwa beberapa genus endofit pada tanaman kunyit putih adalah genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, dan *Klebsiella*. Bakteri yang termasuk dalam genus *Novosphingobium* juga merupakan endofit tanaman, misalnya *Novosphingobium tardaugens* dari *Oryza sativa* (Mano and Morisaki 2008). Chen et al. (2014) berhasil mendapatkan bakteri endofit dari tanaman jahe, di antaranya genus *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Roseateles*, *Sphingomonas*,

Leclercia, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Aeromonas*, *Acetobacter*, *Pantoea*, *Ensifer*, *Herbaspirillum*, dan *Stenotrophomonas*.

Penapisan Kemampuan Tumbuh pada Media Bebas Nitrogen

Beberapa bakteri endofit dari tanaman temu giring diduga memiliki kemampuan untuk memfiksasi N_2 . Berdasarkan data hasil uji sebanyak sebelas isolat dari bagian rimpang, batang dan daun, mampu menambat N_2 . Isolat-isolat tersebut mampu tumbuh pada media bebas N (Tabel 3). Koloni dari sebagian besar isolat adalah berlendir, sedikit kental, putih, halus, dan cembung dengan margin *entire* (Gambar 3). Sepuluh isolat merupakan bakteri Gram negatif (90,91%) dan satu isolat adalah Gram positif (9,09%). Sebagian besar bakteri endofit yang mampu menambat nitrogen adalah kelompok bakteri Gram negatif (Reis et al. 2004; Wei et al. 2014).

Sebanyak lima isolat tumbuh subur pada media bebas N. Berdasarkan pendekatan hasil BLASTN lima isolat tersebut terdiri dari tiga genus di antaranya *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, dan *Starkeya*. Bakteri dari genus *Leclercia*, *Enterobacter* (Ogbo and Okonkwo 2012; Kumar 2014), *Agrobacterium* (Youseif et al. 2014) dilaporkan memiliki aktivitas nitrogenase.

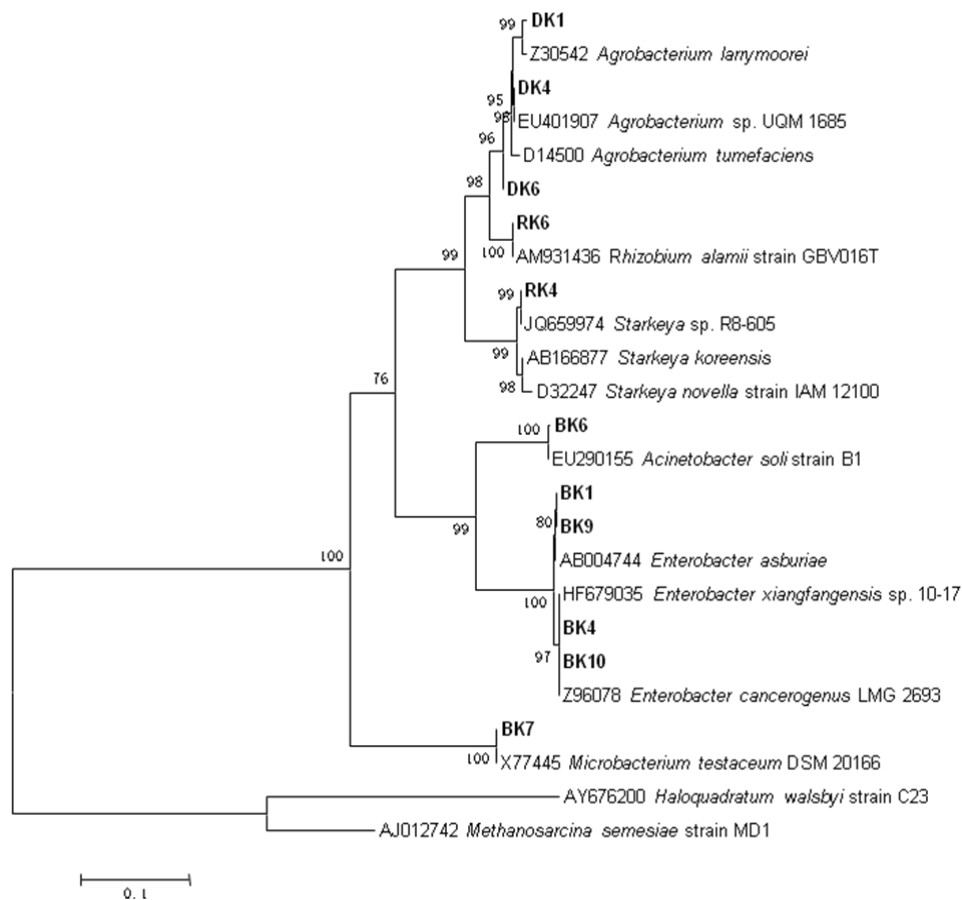


Gambar 3. Bakteri endofit tanaman temu giring yang mampu tumbuh pada media bebas N.

Tabel 3. Daftar bakteri endofit asal tanaman temu giring yang berpotensi menambat nitrogen

Isolat	Identitas isolat
BK1	<i>Enterobacter asburiae</i> voucher ST56
BK4	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain <i>pca7</i>
BK6	<i>Acinetobacter soli</i> strain AT_118
BK7	<i>Microbacterium testaceum</i> strain LAP2-26
BK9	<i>Enterobacter asburiae</i> voucher ST56
BK10	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain <i>pca7</i>
DK1	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> strain R7-597
DK4	<i>Agrobacterium</i> sp. UQM 1685
DK6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CS-30
RK4	<i>Starkeya</i> sp. R8-605
RK6	<i>Rhizobium alamii</i> strain: VAF110B

Berdasarkan analisis pohon filogenetik (Gambar 4), menunjukkan bahwa isolat BK1 dan BK9 merupakan isolat yang sama. Kedua isolat berkerabat dekat dengan *Enterobacter asburiae* dengan persen kesamaan 99% dengan strain referensi. Isolat BK4 dan BK10 secara



Gambar 4. Pohon filogenetik bakteri endofit dari tanaman temu giring yang mampu tumbuh pada media bebas nitrogen dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining*, model *Tamura-3 parameter* dan *Gamma distributed* dengan 1000 replikasi.

filogenetik merupakan isolat yang sama. Kedua isolat berada dalam satu cabang dengan spesies terdekatnya *Enterobacter xiangfangensis* dan *Enterobacter cancerogenus* dengan persen kesamaan sebesar 99% dengan *strain* referensi. Dalam pohon filogenetik, *E. xiangfangensis* dan *E. cancerogenus* memiliki kekerabatan yang sangat dekat, terlihat bahwa dua *E. xiangfangensis* dan *E. cancerogenus* berada pada garis yang sama sehingga untuk mengetahui identitas kedua isolat dengan tepat dapat dilakukan analisis lanjutan, yaitu analisis polifasik.

Berdasarkan hasil analisis sekuen 16S rDNA, isolat DK6 teridentifikasi sebagai *Agrobacterium tumefaciens* dengan persen kesamaan 100% dengan *strain* referensi. Akan tetapi, secara filogenetik menunjukkan bahwa isolat DK6 terpisah dengan spesies terdekatnya *A. tumefaciens*. Isolat DK4 dan RK4 teridentifikasi pada level genus, yaitu *Agrobacterium* sp. dan *Starkeya* sp.

KESIMPULAN

Bakteri endofit yang dapat dikulturkan dari tanaman temu giring yang dikoleksi dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, Indonesia ditemukan sebanyak 17 genus dan 6 kluster. Bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman temu giring pada bagian rimpang, batang dan daun berpotensi menambat nitrogen, dilihat dari kemampuan tumbuh pada media bebas nitrogen. Bakteri yang mampu menambat nitrogen diharapkan dapat digunakan dalam bidang pertanian sebagai pupuk hayati.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada JST-JICA atas bantuan dananya.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rinatu Siswi atas bantuannya selama kegiatan penelitian berlangsung.

DAFTAR ACUAN

- Ahmad, Farah, Iqbal Ahmad, and M. S. Khan. 2008. "Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for Their Multiple Plant Growth Promoting Activities." *Microbiological Research* 163 (2): 173–81. doi:10.1016/j.micres.2006.04.001.
- Chebota, V. K., N. V. Malfanova, a. V. Shcherbakov, G. a. Ahtemova, a. Y. Borisov, B. Lugtenberg, and I. a. Tikhonovich. 2015. "Endophytic Bacteria in Microbial Preparations That Improve Plant Development (Review)." *Applied Biochemistry and Microbiology* 51 (3): 271–77. doi:10.1134/S0003683815030059.
- Chen, T., Z. Chen, G. H. Ma, B. H. Du, B. Shen, Y. Q. Ding, and K. Xu. 2014. "Diversity and Potential Application of Endophytic Bacteria in Ginger." *Genetics and Molecular Research* 13 (3): 4918–31. doi:10.4238/2014. July.4.6.
- Cho, Woong, Joo-Won Nam, Hyun-Jun Kang, Tri Windono, Eun-Kyoung Seo, and Kyung-Tae Lee. 2009. "Zedoarondiol Isolated from the Rhizoma of *Curcuma heyneana* Is Involved in the Inhibition of iNOS, COX-2 and pro-Inflammatory Cytokines via the Downregulation of NF-kappaB Pathway in LPS-Stimulated Murine Macrophages." *International Immunopharmacology* 9 (9): 1049–57. doi:10.1016/j.intimp.2009.04.012.
- Dalal, Jitendra, and Nikhilesh Kulkarni. 2013. "Population Dynamics and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Soybean (*Glycine Max* (L) Merril)." *British Microbiology Research Journal* 3 (1): 96–105.

- Diastuti, Hartiwi, Yana Maolana Syah, Lia Dewi Juliawaty, and Marlia Singgih. 2014. "Antibacterial Activity of Germacrane Type Sesquiterpenes from *Curcuma heyneana* Rhizomes." *Indo J. Chem* 14 (1): 32–36.
- Erko, Stackebrand, and Jonas Ebers. 2006. "Taxonomic Parameters Revisited: Tarnished Gold Standards." *Microbiology Today* 33: 152–55. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Taxonomic+parameters+revisited:+tarnished+gold+standards#0>.
- Franche, Claudine, Kristina Lindström, and Claudine Elmerich. 2009. "Nitrogen Fixing Bacteria Associated with Leguminous and Non-Leguminous Plants." *Plant and Soil* 321 (1-2): 35–59. doi:10.1007/s11104-008-9833-8.
- Hasimun, Patonah, I K Adnyana, Rizka Valentina, and Euis Lisnasari. 2016. "Potential Alpha-Glucosidase Inhibitor From Selected Zingiberaceae Family" 9 (1).
- Kumar, Maheep. 2014. "Bacteria Involving in Nitrogen Fixation and Their Evolutionary Correlation." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (3): 824–30.
- M, Joseph B and Priya. n.d. "(Print) Bioactive Compounds from Endophytes. pdf."
- Mano, Hironobu, and Hisao Morisaki. 2008. "Endophytic Bacteria in the Rice Plant." *Microbes and Environments* 23 (2): 109–17. doi:10.1264/jsme2.23.109.
- McGinnis, Scott, and Thomas L. Madden. 2004. "BLAST: At the Core of a Powerful and Diverse Set of Sequence Analysis Tools." *Nucleic Acids Research* 32 (WEB SERVER ISS.): 20–25. doi:10.1093/nar/gkh435.
- Miller, Kristin I., Chen Qing, Daniel Man Yuen Sze, Basil D. Roufogalis, and Brett A. Neilan. 2012. "Culturable Endophytes of Medicinal Plants and the Genetic Basis for Their Bioactivity." *Microbial Ecology* 64 (2): 431–49. doi:10.1007/s00248-012-0044-8.
- Ogbo, Frank, and Julius Okonkwo. 2012. "Some Characteristics of a Plant Growth Promoting Enterobacter Sp. Isolated from the Roots of Maize" 2012 (September): 368–74.
- Okumura, Ricardo Shigueru, Daiane de Cinque Mariano, Rivanildo Dallacort, Amanda Nogueira de Albuquerque, Allan Klynger da Silva Lobato, Elaine Maria Silva Guedes, Cândido Ferreira de Oliveira Neto, Heráclito Eugênio da Conceição, and Gustavo Antonio Ruffeil Alves. 2013. "Azospirillum: A New and Efficient Alternative to Biological Nitrogen Fixation in Grasses." *Journal of Food, Agriculture and Environment* 11 (1): 1142–46.
- Packeiser, Heiko, Chanyuen Lim, Balaji Balagurunathan, Jinchuan Wu, and Hua Zhao. 2013. "An Extremely Simple and Effective Colony PCR Procedure for Bacteria, Yeasts, and Microalgae." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169 (2): 695–700. doi:10.1007/s12010-012-0043-8.
- Powers, E. M. 1995. "Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10): 3756–58.
- Ratna Sulistiyani, Tri, Puspita Lisdiyanti, and Yulin Lestari. 2014. "Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*." *Microbiology Indonesia* 8 (2): 65–72. doi:10.5454/mi.8.2.4.

- Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, et al. 2004. "Burkholderia Tropica sp. Nov., a Novel Nitrogen-Fixing, Plant-Associated Bacterium." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (6): 2155–62. doi:10.1099/ijs.0.02879-0.
- Riyanto S. 26 April 2010. Yuk, Bikin Cantik Kulit. [www.http://agri-na-online.com/show_article.php?rid=12&aid=2417](http://agri-na-online.com/show_article.php?rid=12&aid=2417). didownload pada 22 Juni 2016.
- Rosenblueth, Mónica, and Esperanza Martínez-Romero. 2006. "Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts." *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 19 (8): 827–37. doi:10.1094/MPMI-19-0827.
- Ruby, E Jalgaonwala. 2011. "A Review: Bacterial Endophytes and Their Bioprospecting." *Journal of Pharmacy Research* 4 (3): 795–99. <http://www.doaj.org/doaj?func=abstract&id=804173>.
- Saitou, N, and M Nei. 1987. "The Neighbour-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Mol Biol Evo* 4: 406–25.
- Santi, Carole, Didier Bogusz, and Claudine Franche. 2013. "Biological Nitrogen Fixation in Non-Legume Plants." *Annals of Botany* 111 (5): 743–67. doi:10.1093/aob/mct048.
- Strobel, Gary, and Bryn Daisy. 2003. "Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67 (4): 491–502. doi:10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, and Sudhir Kumar. 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725–29. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Tan, R X, and W X Zou. 2001. "Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites." *Natural Product Reports* 18 (4): 448–59. doi:10.1039/b100918o.
- Vendan, Regupathy Thamizh, Young Joon Yu, Sun Hee Lee, and Young Ha Rhee. 2010. "Diversity of Endophytic Bacteria in Ginseng and Their Potential for Plant Growth Promotion." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 48 (5): 559–65. doi:10.1007/s12275-010-0082-1.
- Wei, Chun Yan, Li Lin, Li Jing Luo, Yong Xiu Xing, Chun Jin Hu, Li Tao Yang, Yang Rui Li, and Qianli An. 2014. "Endophytic Nitrogen-Fixing Klebsiella Variicola Strain DX120E Promotes Sugarcane Growth." *Biology and Fertility of Soils* 50 (4): 657–66. doi:10.1007/s00374-013-0878-3.
- Youseif, Sameh H., Fayrouz H. Abd El-Megeed, Amr Ageez, Zeinat K. Mohamed, Abdelaal Shamseldin, and Saleh A. Saleh. 2014. "Phenotypic Characteristics and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Soybean in Egyptian Soils." *European Journal of Soil Biology* 60: 34–43. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.10.008.