

AKTIVITAS METABOLIT SEKUNDER PEMACU PERTUMBUHAN DARI BAKTERI ENDOFIT ASAL KUNYIT PUTIH (*Curcuma zedoaria* ROSC)

*Secondary Metabolite Activities of Endophytic Bacteria from White Turmeric (*Curcuma zedoaria* Rosc.) as Plant Growth Promoter*

Tiwit Widowati*, Rumella Simarmata, Nuriyanah, Liseu Nurjanah dan Sylvia J. R. Lekatompessy

Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI
Jalan Raya Bogor KM 46, Cibinong, Bogor 16911

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 24 Juni 2020

Direvisi: 08 September 2020

Disetujui: 26 November 2020

Kata kunci:

Curcuma zedoaria; bakteri endofit; penghasil enzim; pupuk hayati

Keywords:

Curcuma zedoaria; endophytic bacteria; enzyme producer; biofertilizer

ABSTRAK/ABSTRACT

Bakteri endofit mengkolonisasi jaringan tanaman dan berkontribusi terhadap pertumbuhan, perkembangan dan adaptasi tanaman inang. Penelitian bertujuan untuk mengkaji keragaman bakteri endofit dari tanaman kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan mengetahui aktivitasnya sebagai pemacu pertumbuhan tanaman. Tanaman kunyit putih diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro). Isolasi bakteri endofit dari bagian daun, rimpang primer dan sekunder kunyit putih menggunakan media *Nutrient Agar* (NA). Identifikasi dilakukan berdasarkan 16S rDNA. Isolat tersebut selanjutnya diuji kemampuannya sebagai pemacu pertumbuhan tanaman dan penghasil enzim. Berdasarkan karakteristik morfologi, diperoleh 21 isolat, terbanyak diperoleh dari bagian rimpang primer (47,62%), rimpang sekunder (19,05%) dan daun (33,33%). Hasil sekuensing 16S rDNA menunjukkan komunitas bakteri endofit pada tanaman kunyit putih terdiri dari empat filum yaitu β -proteobacteria, γ -proteobacteria, Flavobacteria dan Firmicutes yang merepresentasikan delapan genus. Lima isolat mempunyai aktivitas sebagai pemacu pertumbuhan tanaman, sedang enam isolat menghasilkan enzim. Terdapat 13 isolat mempunyai aktivitas ganda sebagai pemacu pertumbuhan tanaman dan aktivitas enzimatik, sedangkan delapan isolat hanya memiliki salah satu aktivitas tersebut. Bakteri endofit yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman berpotensi digunakan sebagai pupuk hayati untuk menunjang pertumbuhan tanaman kunyit putih.

*Endophytic bacteria colonize the plant tissue and contribute to the host plant's growth, development, and adaptation. This study aimed to examine the endophytic bacteria diversity associated with white turmeric (*Curcuma zedoaria*) and determine its activity as a plant growth promoter. White turmeric plants were obtained from the Indonesian Spices and Medicinal Crop Research Institute (Balitro). The isolation of endophytic bacteria from leaves, a primary and secondary rhizome of white turmeric using *Nutrient Agar* (NA) medium. Identification of the isolates was conducted based on 16S rDNA. The isolates were tested for their ability as a plant growth promoter and enzyme producer. Based on the morphological characteristic, 21 isolates were obtained from the primary rhizome (47.62%), secondary rhizome (19.05%), and leaves (33.33%), respectively. The sequencing result of 16S rDNA showed that the endophytic bacteria community consisted of four phyla, β -proteobacteria, γ -proteobacteria, Flavobacteria, Firmicutes, which represented eight genera. Five isolates had several activities as a plant growth promoter, while six isolates had several enzymatic activities. Thirteen isolates had both activities, as a plant growth promoter and enzyme producer, while eight isolates only had single action. Endophytic bacteria potential as plant growth promoters can be used for supporting the cultivation of white turmeric plants.*

* Alamat Korespondensi : tiwidowati@gmail.com

PENDAHULUAN

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup dan mengkolonisasi jaringan tanaman secara simbiosis mutualisme. Tanaman dapat menjadi inang untuk mikroorganisme dalam menghasilkan metabolit untuk meningkatkan penyerapan nutrisi, memacu pertumbuhan dan meningkatkan biomassa tanaman, serta menginduksi resistensi tanaman terhadap patogen (Xia *et al.* 2015).

Bakteri endofit berpengaruh langsung terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui aktivitas penambatan nitrogen, pelarutan fosfat dan produksi fitohormon. Secara tidak langsung, bakteri endofit meningkatkan ketersediaan dan penyerapan nutrisi, mineral dan air, menginduksi toleransi tanaman inang terhadap cekaman abiotik seperti cekaman osmotik dan paparan logam berat, membantu menekan serangan hama dan penyakit tanaman (dos Santos *et al.* 2018).

Bakteri endofit mempunyai kapasitas untuk mengkolonisasi bagian tanaman seperti akar, batang dan daun sehingga menjadi alternatif untuk memaksimalkan fiksasi nitrogen oleh tanaman. Di dalam proses fiksasi nitrogen, bakteri endofit berasimilasi dengan nitrogen di udara dan mengubahnya menjadi amonia yang digunakan untuk metabolisme tanaman (Gaiero *et al.* 2013). Selain nitrogen, kekurangan fosfor merupakan faktor pembatas bagi perkembangan tanaman. Bakteri endofit mampu mensintesis asam organik dan meningkatkan ketersediaan fosfor bagi tanaman.

Fitohormon merupakan pemacu pertumbuhan tanaman. Bakteri endofit menghasilkan fitohormon seperti *indoleacetic acid* (IAA), *indolebutyric acid* (IBA), giberelin dan sitokinin yang menunjang pertumbuhan dan perkembangan akar serta penyerapan nutrisi, air dan mineral (Gaiero *et al.* 2013). Beberapa bakteri endofit juga menghasilkan enzim seperti protease, kitinase, lipase, selulase, pektinase dan amilase (Ek-Ramos *et al.* 2019).

Keragaman bakteri endofit dari kelompok tanaman obat famili Zingiberaceae sangat tinggi. Sebanyak 17 genus bakteri berhasil diidentifikasi dari temu giring (*Curcuma heyneana*) (Sulistiyani dan Lisdiyanti 2016). Vinarayani dan Prakash (2018) melaporkan terdapat 20 jenis bakteri endofit diisolasi dari tanaman kunyit (*C. longa*) yang termasuk dalam 12 genus berbeda. Selain itu, juga terdapat 107 bakteri endofit dari tanaman jahe (*Zingiber officinale*) yang dikelompokkan dalam

16 genus (Chen *et al.* 2014). Rimpang kunyit putih (*C. zedoaria*) mempunyai efek farmakologis, diantaranya sebagai antikanker, antibakteri, antifungi dan antioksidan (Sulistiyani 2014). Senyawa bioaktif yang terdapat dalam kunyit putih diduga berkaitan dengan keberadaan mikroba endofit dalam tanaman tersebut.

Bakteri endofit dari tanaman obat tidak hanya berpotensi sebagai bahan baku obat, tetapi dapat juga diaplikasikan di bidang pertanian sebagai pemacu pertumbuhan dan hasil tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji keragaman bakteri endofit pada tanaman kunyit putih dan mengetahui potensinya sebagai pemacu pertumbuhan tanaman.

BAHAN DAN METODE

Isolasi bakteri

Tanaman kunyit putih (*C. zedoaria* Rosc.) diperoleh dari kebun koleksi Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor. Tanaman diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bakteri endofit diisolasi dari jaringan tanaman mengikuti metode Tomita (2003). Sampel tanaman dicuci dengan air mengalir selama 10 menit kemudian dipotong menjadi beberapa bagian dengan panjang 2-3 cm dan dipisahkan antara rimpang dan daun. Masing-masing bagian tanaman kemudian disterilisasi dengan cara direndam dalam larutan alkohol 75% selama 1 menit. Setiap sampel dari daun, rimpang primer dan sekunder diambil sebanyak dua spesimen. Potongan bagian tanaman kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 5,3% selama 5 menit dan alkohol selama 0,5 menit, kemudian dikeringkan menggunakan kertas tisu steril. Potongan sampel dibelah dengan pisau steril dan diletakkan di atas permukaan media *Nutrient Agar* (NA) yang ditambah Nystatin 100 mg.l⁻¹ (Tomita 2003) dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 2–15 hari.

Pemurnian bakteri

Bakteri endofit yang telah tumbuh dimurnikan beberapa kali pada media NA hingga diperoleh koloni tunggal. Bakteri endofit kemudian disimpan dalam medium NA miring sebagai biakan kerja serta disimpan dalam bentuk gliserol dengan konsentrasi 10% dan diinkubasi dalam lemari pendingin dengan suhu -80°C.

Karakterisasi bakteri

Karakterisasi morfologi bakteri endofit dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi bentuk, ukuran, warna, bentuk tepi dan elevasi koloni (Wulandari dan Purwaningsih 2019). Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara pewarnaan Gram (Lay 1994) untuk mengetahui bentuk dan susunan sel. Tahapan pewarnaan Gram diawali dengan pembuatan preparat bakteri kemudian difiksasi di atas api. Preparat diberi larutan kristal violet selama 1 menit kemudian dicuci air. Selanjutnya preparat diberi larutan Lugol selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Etanol 96% kemudian ditambahkan ke dalam preparat, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Langkah selanjutnya pemberian larutan safranin ke dalam preparat selama 15 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x.

Identifikasi bakteri berdasar sikuen 16S rDNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode PCR koloni (Packer et al. 2013). Satu koloni isolat bakteri diambil menggunakan tusuk gigi, dimasukkan ke dalam tabung mikro kemudian ditambahkan PCR mix. Volume total PCR sebanyak 50 µl yang terdiri dari 2 µl untuk masing-masing primer 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') dan primer 1492 R (5'- GTT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'), 15 µl PCR mix (my Taq) dan 31 µl ddH₂O. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus yang terdiri dari tahap pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 1 detik, denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, penempelan pada suhu 52°C selama 15 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama 45 menit dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR dielektroforesis selama 35 menit dengan voltase 100 V 500 cmA (BIO-RAD Mupid-exU-75577) kemudian disekuensing dua arah *forward* and *reverse*. Hasil analisis sikuen 16S rDNA dari bakteri dibandingkan dengan sikuen 16S rDNA yang terdaftar di Bank Gen menggunakan *Blastn* pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) untuk mengetahui homologinya dengan bakteri lain.

Seleksi bakteri pemacu pertumbuhan tanaman

Seluruh isolat bakteri diseleksi kemampuannya sebagai penghasil hormon IAA,

pelarut fosfat, penambat nitrogen dan penghasil enzim. Seleksi untuk produksi hormon IAA menggunakan metode Dey *et al.* (2004). Isolat bakteri ditumbuhkan dalam media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 0,5 mM L-triptofan. Kultur diinkubasi dalam *shaker* pada suhu 28°C dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Selanjutnya, kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan sebanyak 2 ml dicampur dengan 2 ml reagen Salkowsky dan diinkubasi selama 60 menit di ruang gelap kemudian dibaca kepadatannya pada panjang gelombang 530 nm. Warna merah muda mengindikasikan adanya produksi IAA.

Pengujian bakteri pelarut fosfat menggunakan media Pikovskaya dengan komposisi per liter sebagai berikut: 5 g Ca₃(PO₄)₂; 10 g glukosa; 0,2 g NaCl; 0,2 KCl; 0,1 g MgSO₄.7H₂O, 0,5 g (NH₄)₂SO₄; 0,5 g yeast ekstrak; 0,0025 g Mn.SO₄.7H₂O; 0,0025 g FeSO₄.7H₂O, dan 15 g agar-agar. Isolat ditumbuhkan pada media Pikovskaya dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar isolat mengindikasikan kemampuan isolat melarutkan fosfat (Sharon *et al.* 2016) dan dihitung indeksnya berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Indeks Pelarut Fosfat} = \frac{\text{diameter koloni} - \text{diameter zona}}{\text{diameter koloni}}$$

Aktivitas nitrogenase diuji mengikuti metode Baldani *et al.* (2014). Isolat ditumbuhkan di media NB kemudian diinokulasikan ke dalam tabung berisi media semi solid *Nitrogen-free Bromthymol Blue* (NfB). Media NfB terdiri dari 5 g asam malat; 0,5 g K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1 NaCl, 0,02 g CaCl₂.2H₂O; 2 ml unsur mikro (0,04 g CuSO₄.5H₂O; 0,012 g ZnSO₄.7H₂O; 0,14 g H₃BO₃; 0,1 g Na₂MoO₄.2H₂O; 0,15 g MnSO₄.H₂O dan 100 ml akuades), 2 ml larutan Bromtymol Blue (11,2 g KOH; 0,5 g BTB, dan 100 ml akuades), 4 ml Fe-EDTA 1,64%; 4 g KOH, 1 ml larutan vitamin (0,01 g Biotin; 0,02 g pyrodoxol HCl, dan 100 ml akuades); 2,3 g agar-agar dan 1 l akuades. Media kultur diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam. Adanya pelikel warna putih di bawah permukaan media semi solid NfB menunjukkan bahwa isolat memiliki aktivitas nitrogenase.

Pengujian aktivitas enzim amilase dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada cawan petri berisi media *Starch Agar* (NA) 1% yang terdiri dari 20 g NA, 10 g *soluble starch* dan

1000 ml akuades. Media kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Serbuk Iodin (I₂) diletakkan pada tutup cawan petri dan diinkubasi selama beberapa menit hingga seluruh media berubah menjadi warna ungu. Zona bening yang terbentuk di sekitar isolat menunjukkan bahwa isolat mampu mendegradasi amilase (Hastuti *et al.* 2014) dan indeksnya dihitung dengan rumus:

$$\text{Indeks Amilolitik} = \frac{\text{diameter koloni} - \text{diameter zona}}{\text{diameter koloni}}$$

Pengujian aktivitas enzim protease menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). Media SMA terdiri dari 1 g pepton 0,1%; 5 g NaCl 0,5%; 20 g agar-agar, dan 500 ml akuades. Susu skim 100 g dilarutkan dalam 500 ml akuades dan disterilisasi pada suhu 100°C selama 10 menit. Selanjutnya media susu dicampur dengan media agar steril dan dituang ke cawan petri. Isolat bakteri ditumbuhkan di media cawan petri dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar isolat mengindikasikan bahwa isolat dapat mendegradasi protease (Hamdani *et al.* 2019) dan dihitung indeksnya dengan rumus:

$$\text{Indeks Preteolitik} = \frac{\text{diameter koloni} - \text{diameter zona}}{\text{diameter koloni}}$$

Seleksi bakteri penghasil enzim selulase dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada cawan petri berisi media *carboxymethyl cellulase* (CMC) 1%. Media CMC terdiri dari 10 g CMC; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; 0,75 g KNO₃; 0,02 g K₂HPO₄; 0,04 g CaCl₂.H₂O; 15 g agar-agar, dan 1000 ml

buffer fosfat. Media kultur diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam kemudian dicuci dengan larutan merah congo (*congo red*) 0,1% selama 10 menit dan dibilas dengan NaCl 1%. Zona bening yang terbentuk di sekitar isolat menunjukkan bahwa isolat mampu mendegradasi selulase (Ferbiyanto *et al.* 2015), indeksnya dihitung dengan persamaan:

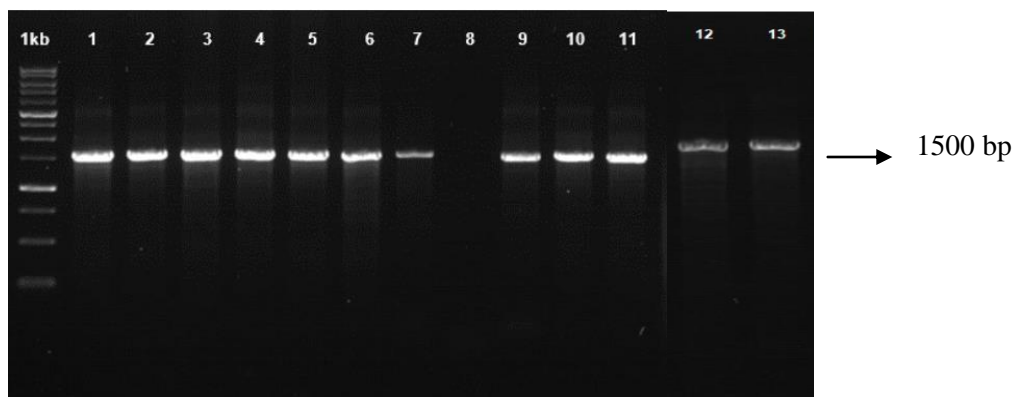
$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{diameter koloni} - \text{diameter zona}}{\text{diameter koloni}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tanaman sampel adalah *C. zedoaria*. Diperoleh 21 isolat bakteri endofit dari tanaman kunyit putih, terbanyak dari bagian rimpang primer (47,62%) diikuti dari daun (33,33%) dan terendah dari bagian rimpang sekunder (19,05%). Populasi mikroba endofit dari bagian akar atau rimpang tertinggi jika dibandingkan bagian tanaman lainnya karena akar merupakan tempat masuknya mikroba ke dalam jaringan tanaman (Dalal dan Kulkarni 2013). Sulistiyani *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa populasi bakteri endofit dari tanaman kunyit putih paling banyak ditemukan pada bagian rimpang.

Bakteri endofit dapat ditemukan di hampir semua bagian tanaman inang termasuk akar, batang, daun, buah dan umbi. Populasi dan jenis bakteri, tidak hanya dipengaruhi oleh spesies, varietas, umur, kesehatan dan fase perkembangan tanaman, tetapi juga oleh faktor lingkungan seperti tanah, iklim dan musim (Elmagzob *et al.* 2019).



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen 16S rDNA bakteri endofit kunyit putih
 Figure 1. The 16S rDNA gene amplification from endophytic bacteria of white turmeric

Karakterisasi bakteri

Karakteristik morfologi bakteri endofit secara makroskopis adalah sebagian besar berbentuk *circular*, berukuran kecil, tepian *undulate*, elevasi *raised* dengan warna putih bening dan putih susu. Sementara itu, karakteristik morfologi secara mikroskopis menunjukkan sebagian bakteri endofit berbentuk batang. Tujuh isolat merupakan Gram positif dan 14 isolat bakteri Gram negatif yang mengindikasikan bakteri endofit pada tanaman kunyit putih didominasi oleh bakteri Gram negatif. Sulistiyani (2014) juga menyatakan bahwa bakteri endofit kunyit putih didominasi oleh bakteri Gram negatif.

Analisis sikuen 16S rDNA bakteri endofit tanaman kunyit putih

Isolat bakteri selanjutnya diidentifikasi pada tingkat spesies dengan analisis 16S rDNA. Sikuen 16S rDNA bersifat lestari, spesifik antara spesies yang berbeda pada bakteri dan arkea, dapat digunakan untuk klasifikasi dan identifikasi bakteri serta membuat pohon kekerabatan (Sun *et al* 2008). Amplifikasi sikuen yang diperoleh sebanyak 1500 bp (Gambar 1).

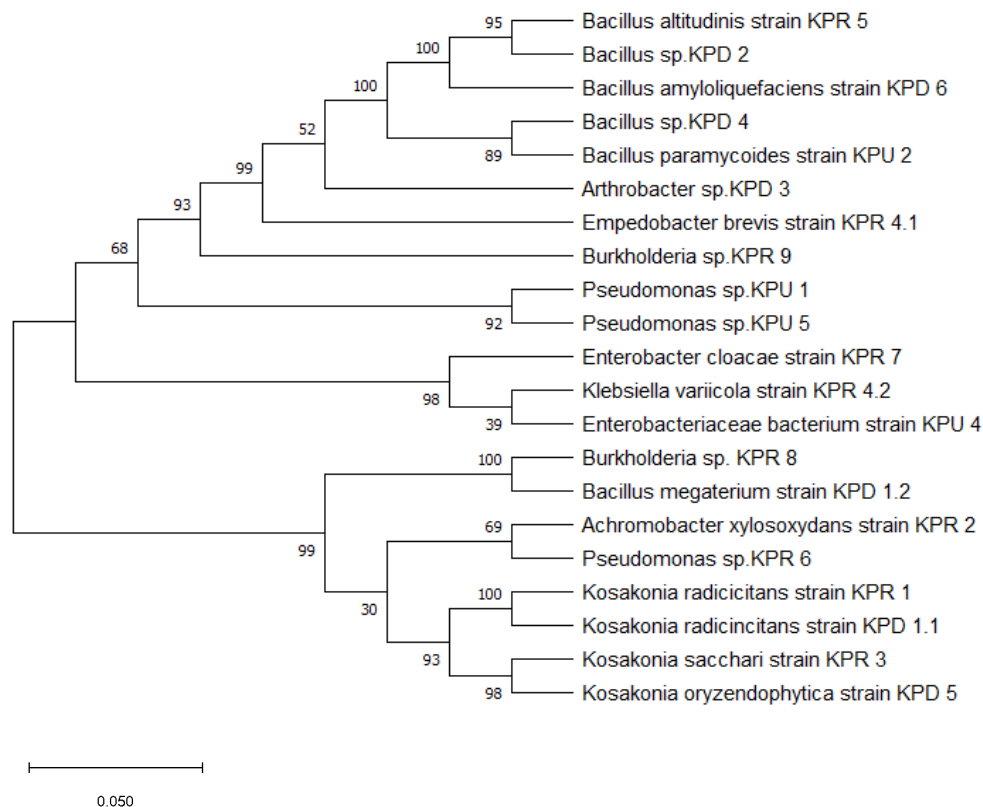
Hasil sikuen menunjukkan 11 isolat memiliki persentase kesamaan hingga 99% dengan sikuen yang ada pada Bank Gen, sedangkan 10 isolat mempunyai kesamaan 97% dan 98% (Tabel 1). Drancourt *et al* (2000) menyatakan bahwa identifikasi pada tingkat spesies ditetapkan dari similitas 16S rDNA $\geq 99\%$ dengan sikuen yang ada pada Bank Gen, tingkat genus dengan similitas $\geq 97\%$ dan untuk identifikasi genus dengan similitas $< 97\%$.

Hubungan pengelompokan kekerabatan menunjukkan isolat bakteri endofit dikelompokkan menjadi empat filum yang didominasi oleh γ -*proteobacteria* (10 isolat), *Firmicutes* (6 isolat), β -*proteobacteria* (4 isolat) dan *Flavobacteria* (satu isolat) (Gambar 2). Sulistiyani *et al.* (2014) melaporkan bahwa keragaman bakteri endofit dari tanaman kunyit putih dikelompokkan menjadi 5 filum dan didominasi oleh γ -*proteobacteria*. Filum *Proteobacteria* termasuk α , β dan γ -*proteobacteria* merupakan filum yang mendominasi keragaman bakteri endofit, meskipun filum lain seperti *Firmicutes* dan *Actinobacteria* sering ditemukan juga sebagai endofit (Santoyo *et al.* 2016). Keragaman populasi bakteri endofit dipengaruhi oleh fase pertumbuhan, bagian jaringan dan kesehatan tanaman serta jenis tanah termasuk kemasaman dan kelembapannya.

Tabel 1. Tingkat kesamaan sikuen gen 16S rDNA bakteri endofit kunyit putih

Table 1. The similarity level of 16S rDNA gene from endophytic bacteria of white turmeric

No	Isolat	Bagian tanaman	Identitas terdekat dengan referensi data Bank Gen	Nomor akses	Kesamaan (%)
1	KPR 1	Rimpang primer	<i>Kosakonia radicicicans</i>	MN841788.1	99,17
2	KPR 2	Rimpang primer	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	MN904889.1	97,46
3	KPR 3	Rimpang primer	<i>Kosakonia sacchari</i>	MK543040.1	99,03
4	KPR 4.1	Rimpang primer	<i>Empedobacter brevis</i>	NR112974.1	99,57
5	KPR 4.2	Rimpang primer	<i>Klebsiella variicola</i>	MW036529.1	99,65
6	KPR 5	Rimpang primer	<i>Bacillus altitudinis</i>	MN511801.1	99,24
7	KPR 6	Rimpang primer	<i>Pseudomonas</i> sp.	MN955581.1	97,66
8	KPR 7	Rimpang primer	<i>Enterobacter cloacae</i>	KR822277	99,65
9	KPR 8	Rimpang primer	<i>Burkholderia</i> sp.	MH756747.1	99,76
10	KPR 9	Rimpang primer	<i>Burkholderia</i> sp.	HE821232.1	99,36
11	KPU 1	Rimpang sekunder	<i>Pseudomonas</i> sp.	LC484693.1	99,44
12	KPU 2	Rimpang sekunder	<i>Bacillus paramycooides</i>	MT332159.1	99,17
13	KPU 4	Rimpang sekunder	<i>Enterobacteriaceae</i>	KC153294.1	99,51
14	KPU 5	Rimpang sekunder	<i>Pseudomonas</i> sp.	AB638853.1	99,51
15	KPD 1.1	Daun	<i>Kosakonia radicincicans</i>	MN841788.1	98,84
16	KPD 1.2	Daun	<i>Bacillus megaterium</i>	KM064628.1	98,73
17	KPD 2	Daun	<i>Bacillus</i> sp.	KU986705.1	99,45
18	KPD 3	Daun	<i>Arthrobacter</i> sp.	KF479650.1	98,53
19	KPD 4	Daun	<i>Bacillus</i> sp.	JN592457.1	99,79
20	KPD 5	Daun	<i>Kosakonia oryzendophytica</i>	MK560039.1	99,27
21	KPD 6	Daun	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GU568203.1	99,02



Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri endofit asal kunyit putih berdasarkan sikuen gen 16S rDNA
 Figure 2. Phylogenetic tree of endophytic bacteria from white turmeric based on 16S rDNA sequences

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit pada tanaman kunyit putih didominasi oleh genus *Bacillus* dan *Enterobacter*. Populasi bakteri endofit terdiri dari genus *Bacillus* (6 isolat), *Enterobacter* (empat isolat), *Pseudomonas* (tiga isolat), *Achromobacter*, *Klebsiella*, dan *Burkholderia* (masing-masing dua isolat) serta *Empedobacter* dan *Pantoea* (masing-masing satu isolat). Beberapa genus yang berhasil diisolasi pada penelitian ini merupakan genus yang sering ditemukan sebagai bakteri endofit. Santoyo *et al.* (2016) menyatakan genus yang sering ditemukan sebagai bakteri endofit adalah *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Stenophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* dan *Microbacterium*.

Bakteri dari genus *Bacillus* ditemukan pada semua bagian tanaman, sedangkan genus lain ditemukan di satu atau dua bagian tanaman. Populasi bakteri dari sampel ini didominasi oleh filum γ -*proteobacteria* yang ditemukan di semua bagian tanaman. Sulistiyani (2014) menyatakan bahwa populasi bakteri endofit dari tanaman kunyit putih didominasi oleh filum γ -*proteobacteria* dengan jumlah spesies bakteri dari genus *Bacillus* lebih tinggi dibanding lainnya. Bakteri dari genus *Bacillus* sangat mudah ditumbuhkan sehingga

dapat ditemukan pada semua tanaman (Miller *et al.* 2012).

Hasil uji aktivitas bakteri endofit kunyit putih menunjukkan bahwa semua isolat berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman. Dua isolat dari rimpang primer yang berpotensi sebagai pelarut fosfat, delapan isolat penghasil hormon tumbuh IAA dan 16 isolat sebagai penambat nitrogen (Tabel 2). Beberapa isolat tersebut diambil dari bagian rimpang dan daun.

Sebagian besar isolat yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman adalah kelompok bakteri Gram negatif. Tujuh isolat merupakan bakteri Gram positif (33%) dan 21 isolat adalah Gram negatif (67%). Beberapa isolat mempunyai aktivitas ganda seperti *Pseudomonas* sp. KPR 6, *Pseudomonas* sp. KPU 1 dan *Bacillus* sp. KPD 2 yang mempunyai aktivitas sebagai penambat nitrogen dan penghasil hormon tumbuh IAA (Tabel 2). Sementara itu, isolat *Burkholderia* sp. KPR 8 dan *Burkholderia* sp. KPR 9 berpotensi sebagai pelarut fosfat dan penambat nitrogen (Tabel 2). Kandel *et al.* (2017) melaporkan bahwa bakteri endofit *Burkholderia* dari famili Salicaceae memiliki aktivitas sebagai pemacu pertumbuhan tanaman melalui mekanisme sebagai pelarut fosfat, penghasil IAA dan biokontrol.

Tabel 2. Aktivitas pemacu pertumbuhan tanaman dan penghasil enzim dari bakteri endofit kunyit putih
 Table 2. The activity of endophytic bacteria from white turmeric as plant growth promoter and enzyme producer

Kode isolat	BPF	IAA	N-fix	Amilase	Protease	Selulase
<i>Kosakonia radicincitans</i> KPR 1	-	-	+	-	-	-
<i>Achromobacter xylosoxydans</i> KPR 2	-	-	+	-	-	-
<i>Kosakonia sacchari</i> KPR 3	-	-	+	-	-	-
<i>Empedobacter brevis</i> KPR 4.1	-	+	-	-	+	-
<i>Klebsiella variicola</i> KPR 4.2	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus altitudinis</i> KPR 5	-	-	+	-	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. KPR 6	-	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i> KPR 7	-	+	-	-	-	-
<i>Burkholderia</i> sp. KPR 8	+	-	+	-	+	-
<i>Burkholderia</i> sp. KPR 9	+	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. KPU 1	-	+	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. KPU 2	-	-	+	+	+	+
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> KPU 4	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. KPU 5	-	-	+	-	-	-
<i>Kosakonia radicincitans</i> KPD 1.1	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i> KPD 1.2	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus</i> sp. KPD 2	-	+	+	-	+	+
<i>Arthrobacter</i> sp. KPD 3	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp. KPD 4	-	+	-	-	+	-
<i>Kosakonia sacchari</i> KPD 5	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KPD 6	-	-	+	-	+	+

Keterangan/Note : + : memiliki aktivitas/*possess activity*; - : tidak memiliki aktivitas/*no activity*

Bakteri endofit berinteraksi dengan tanaman inang diantaranya dengan cara memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, menghasilkan IAA dan siderofor seperti pada rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman. Nitrogen merupakan faktor pembatas utama pertumbuhan tanaman. Beberapa bakteri diketahui mampu memfiksasi nitrogen dan menyediakan N untuk tanaman inang, diantaranya *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*,

Azotobacter, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Herbasprillum* dan *Gluconobacter* (Yadav *et al.* 2017). Banyaknya jumlah gen mikroba yang terlibat dalam siklus N menunjukkan bahwa proses nitrifikasi oksidasi amonia pada tanaman dipengaruhi oleh mikroba endofit. Sejumlah bakteri endofit memiliki gen fiksasi nitrogen dan denitrifikasi (Liu *et al.* 2017).

Fosfor adalah makronutrien penting yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman setelah nitrogen. Bakteri secara biologis mampu melarutkan P anorganik yang tidak larut di tanah menjadi tersedia bagi tanaman melalui sekresi asam organik (Maela dan Serepa-Dlamini, 2019). Sejumlah mikroba dari genus *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* dan *Azotobacter* merupakan pelarut fosfat (Yadav *et al.* 2012).

IAA berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman termasuk pemanjangan dan pembelahan sel tanaman. Bakteri endofit dari genus *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* diketahui menghasilkan fitohormon IAA dan mempunyai kemampuan tumbuh dalam media bebas nitrogen (Patel dan Archana., 2017). IAA dengan level rendah akan memacu pemanjangan akar primer, sedangkan IAA level tinggi merangsang pembentukan akar lateral dan adventif tetapi menghambat pertumbuhan akar primer sehingga menyebabkan tanaman abnormal. Dengan demikian, IAA yang dihasilkan bakteri endofit dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan mengubah keseimbangan hormon tanaman (El-Deeb *et al.* 2012).

Hasil uji aktivitas enzimatis menunjukkan isolat dari genus *Bacillus* dominan sebagai penghasil enzim (Tabel 2). *Bacillus* sp. KPU 2 berpotensi menghasilkan tiga jenis enzim. Sementara bakteri dari genus *Bacillus*, *Arthrobacter* dan *Enterobacter* menghasilkan enzim protease dan selulase, sedangkan *Empedobacter*, *Burkholderia* dan *Klebsiella* hanya menghasilkan enzim protease. Adanya aktivitas enzimatis protease dan selulase ditunjukkan oleh bakteri yang diisolasi dari rimpang dan daun, sedangkan enzim amilase hanya dihasilkan oleh satu isolat dari rimpang sekunder.

Enzim hidrolitik bakteri endofit sangat penting untuk kolonisasi akar tanaman. Adanya variasi aktivitas enzimatis yang dihasilkan oleh berbagai isolat, kemungkinan berpengaruh terhadap kolonisasi inter/intra seluler. Bakteri endofit diduga mempunyai mekanisme pengiriman sinyal yang secara khusus mengatur jumlah dan waktu produksi enzim. Tanaman dapat menerima sinyal dari bakteri dan mengatur respon bakteri (El-Deeb *et al.* 2012).

Peningkatan pertumbuhan tanaman melalui aktivitas enzimatis merupakan mekanisme lain yang digunakan oleh bakteri pemacu pertumbuhan tanaman. Bakteri pemacu pertumbuhan tanaman dapat menghasilkan enzim seperti kitinase, dehydrogenase, amilase, β -glukanase, lipase, fosfatase, protease, selulase,

yang menekan patogen dengan cara mendegradasi dinding sel. Melalui aktivitas enzim tersebut, bakteri pemacu pertumbuhan tanaman berperan dalam melindungi tanaman dari cekaman biotik dan abiotik seperti kekeringan, salinitas, suhu tinggi dan logam berat (Pacifico *et al.* 2019), serangan jamur patogen *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* dan *Phythium ultimum* (Yadav *et al.* 2017).

KESIMPULAN

Bakteri dari filum γ -*proteobacteria* dominan pada semua sampel tanaman kunyit putih dan bakteri yang termasuk genus *Bacillus* ditemukan pada semua bagian tanaman. Lima bakteri endofit asal tanaman kunyit putih memiliki aktivitas ganda sebagai pelarut fosfat dan penambat nitrogen atau penghasil hormon IAA dan penambat nitrogen. Selain itu, terdapat satu isolat yang memiliki tiga aktivitas enzimatis amilase, protease dan selulase. Bakteri yang mempunyai aktivitas pemacu pertumbuhan tanaman berpotensi sebagai pupuk hayati, khususnya dalam budidaya tanaman kunyit putih.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada KemenRistekDikti untuk pendanaan penelitian melalui Program Insinas 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H. & Baldani, V.L.D. (2014) The Art of Isolating Nitrogen-Fixing Bacteria from Non-Leguminous Plants Using N-Free Semi Solid Media: A Practical Guide for Microbiologist. *Plant and soil*. 384 (1–2), 413–431. doi:10.1007/s11104-014-2186-6.
- Chen, T., Chen, Z., Ma, G.H., Du, B.H., Shen, B., Ding, Y.Q. & Xu, K. (2014). Diversity and Potential Application of Endophytic Bacteria in Ginger. *Genetics and Molecular Research*. 13 (3), 4918-4931.
- Dalal, J. & Kulkarni, N. (2013) Population Dynamics and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *British Microbiology Research Journal International*. 3 (1), 96–

105.

- Dey, R., Pal, K.K., Bhat, D.M. & Chauhan, S.M. (2004). Growth Promotion and Yield Enhancement of Peanut (*Arachis hypogea* L.) by Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Microbiology Research*. 159, 371-394
- dos Santos, M.L., Bertz, D.L., Wiest, S.H.F., Schunemann, R., Knaak, N. & Fiuza, L. M. (2018). Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 61, 1-11
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayrall, J.P. & Raoult, D. (2000) 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacteria Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(10), 3623-3630
- Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A.A., Rodriguez-Padilla, C., Gonzalez-Ochoa. & Tamez-Guerra, P. (2019). Bioactive Products from Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 10, 1-12.
- El-Deeb, B., Bazaid, S., Gherbawy, Y. & Elhariry, H. (2012) Characterization of Endophytic Bacteria Associated with Rose Plant (*Rosa damascena* trigintipeta) during Flowering Stage and Their Plant Growth Promoting Traits. *Journal of Plant Interactions*. 7 (3), 248–253. doi:10.1080/17429145.2011.637161.
- Elmagzob, A.A.H., Ibrahim, M.M. & Zhang, G.F. (2019). Seasonal Diversity of Endophytic Bacteria Associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. *Diversity*. 11(7), 1-15
- Ferbiyanto, A., Rusmana, I. & Raffiudin, R. (2015). Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from Gut of Worker *Macrotermes gilvus*. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22, 197-200
- Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S. & Dunfield, K.E. (2013) Inside the Root Microbiome: Bacterial Root Endophytes and Plant Growth Promotion. *American Journal of Botany*. 100 (9), 1738–1750. doi:10.3732/ajb.1200572.
- Hamdani, S., Asstiyani, N., Astriany, D., Singgih, M. & Ibrahim, S. (2019). *Isolation and Identification of Proteolytic Bacteria from Pig Sludge and Protease Activity Determination*. In: *International Conference on Green Agro-Industry and Bioeconomy*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences. 230, 1-8. doi:10.1088/1755-1315/230/1/012095
- Hastuti, U.S., Yakub, P. & Khasanah, H.N. (2014) Biodiversity of Indigenous Amylolytic and Cellulolytic Bacteria in Sago Waste Product at Sasupu, North Moluccas. *Journal of Life Sciences*. 8 (11), 920–924.
- Kandel, S.L., Firrincieli, S., Okubara, P.A., Leston, N.D., McGeorge, K.M., Harfouche, A., Kim, S. & Doty, S.L. (2017). An in Vitro Study of Bio-Control and Plant Growth Promotion Potential of Salicaceae Endophytes. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1-16.
- Lay, B.W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta. Raja Grafindo Persada
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M.J. & Schenk, P.M. (2017) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2017.02552.
- Maela, P.M. & Serepa-Dlamini, M.H. (2019). Current Understanding of Bacterial Endophytes, Their Diversity, Colonization and Their Roles in Promoting Plant Growth. *Applied Microbiology*. 5 (1), 1-12
- Miller, K.I., Qing, C., Sze, D.M., Roufogalis, B.D. & Neilan, G.A. (2012). Culturable Endophytes of Medicinal Plants for Antityrosinase and Antioxidant Activities. *International Journal of PharmTech Research*. 3, 1107-1112
- Pacifico, D., Squartini, A., Crucitti, D., Barizza, E., Schiavo, F.L., Muresu, R., Carimi, F. & Zottini, M. (2019). The Role of the Endophytic Microbiome in Grapevine Respose to Environmental Triggers. *Frontiers in Plant Science*. 10(1256), 1-15
- Packeiser, H., Lim, C., Balagurunathan, B., Wu, J. & Zhao, H. (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.
- Patel, J.K. & Archana, G. (2017). Diverse Culturable Diazotrophic Endophytic Bacteria

- from Poaceae Plants Show Cross-Colonization and Plant Growth Promotion in Wheat. *Plant Soil*. 417, 99-116
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C. & Glick, B.R. (2016). Plant Growth Promoting Bacterial Endophytes. *Microbiological Research*. 183, 92-99
- Sharon, J.A., Hathwaik, L.T., Glenn, G.M., Imam, S.H. & Lee, C.C. (2016) Isolation of Efficient Phosphate Solubilizing Bacteria Capable of Enhancing Tomato Plant Growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 16 (2), 525-536. doi:10.4067/S0718-95162016005000043.
- Sulistiyani, T.R., Lisdiyanti, P. & Lestari, Y. (2014). Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*. *Microbiology Indonesia*. 8 (2), 65-72
- Sulistiyani, T.R. & Lisdiyanti, P. (2016) Keragaman Bakteri Endofit dari Tanaman *Curcuma heyneana* dan Potensinya dalam Menambat Nitrogen. *Widyariset*. 2 (2), 106-117.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X. & Dai, X. (2008). Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbial Ecology*. 55, 415-424
- Tomita, F. (2003) Endophytes in Southeast Asia and Japan: Their Taxonomic Diversity and Potential Applications. *Fungal Diversity*. 14, 187-204.
- Vinayarani, G. & Prakash, H.S. (2018). Growth Promoting Rhizospheric and Endophytic Bacteria from *Curcuma longa* L. as Biocontrol Agents against Rhizome Rot and Leaf Blight Diseases. *Plant Pathology Journal*. 34 (3), 218-2235
- Wulandari, D. & Purwaningsih, D. (2019) Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik pada Umbi *Colocasia esculenta* L. secara Morfologi, Biokimia dan Molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 6 (2), 247-258.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D. & Williams, M.A. (2015). Characterization of Culturable Bacterial Endophytes and Their Capacity to Promote Plant Growth from Plants Grown using Organic or Conventional Practices. *Frontiers Plant Science*. 6, 1-10
- Yadav, A.N., Verma, P., Singh, B., Chauhan, V.S., Suman, A. & Saxena, A.K. (2017) Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and Multifunctional Attributes for Sustainable Agriculture. *Advances in Biotechnology and Microbiology*. 5 (5), 1-17.