

Potensi dan Keragaman Bakteri Endofit sebagai Agens Pemacu Pertumbuhan dan Biokontrol Anggrek

(Potential and Diversity of Endophyte Bacteria as Orchid Growth Supporting Agent and Biocontrol)

Mery Irianti Amba Linggi^{1*}, Tri Joko², Jaka Widada³

(Disetujui Mei 2023/Disetujui Agustus 2023)

ABSTRAK

Penyakit busuk lunak pada tanaman anggrek menjadi faktor turunnya produksi anggrek. Salah satu cara pengendalian hayati yang berpotensi memacu pertumbuhan dan biokontrol penyakit ialah dengan memanfaatkan bakteri endofit. Penelitian ini bertujuan mendeskripsikan keragaman bakteri endofit anggrek yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan dan agens biokontrol. Parameter pengamatan meliputi produksi asam indol asetat (IAA), pelarutan fosfat anorganik, produksi amonia bakteri endofit anggrek, dan antagonisme bakteri endofit terhadap bakteri patogen penyebab busuk lunak secara *in vitro*. Keragaman bakteri endofit anggrek dianalisis menggunakan rep-PCR dengan primer BOX-A1R. Hasilnya menunjukkan bahwa 10 isolat bakteri endofit anggrek mampu memproduksi IAA dengan konsentrasi 79–321 µg/mL, mampu melarutkan fosfat, dan memproduksi amonia. Pada pengujian antagonisme terhadap bakteri penyebab busuk lunak, semua isolat tersebut mampu membentuk zona hambat dengan diameter 3–7,2 cm. Selanjutnya, analisis keragaman menggunakan rep-PCR memperlihatkan isolat bakteri endofit DnPh5, BgCt2, BgVt10, DnLp7, DnB11, dan DnAr4 memiliki pola pita DNA yang seragam sehingga berkelompok menjadi satu. Sementara itu, isolat TbPh7, lbtPhm1, DnDr2, dan AkOc1 menunjukkan pola pita DNA yang berbeda sehingga mengindikasikan keempat isolat tersebut merupakan spesies atau subspecies bakteri berbeda. Pada analisis dendrogram, isolat DnPh5, BgCt2, BgVt10, DnLp7, DnB11, dan DnAr4 mempunyai persentase kesamaan 100%. Similaritas isolat lbtPhm1, DnDr2, dan AkOc1 masing-masing adalah 90%, 79%, dan 68% terhadap enam isolat lainnya. Isolat TbPh7 merupakan isolat dengan tingkat similaritas rendah terhadap isolat lainnya, yaitu sekitar 51%.

Kata kunci: anggrek, bakteri endofit, pemacu pertumbuhan, agen biokontrol, rep-PCR

ABSTRACT

Soft rot disease in orchid plants is a factor in decreasing orchid production. One way of biological control that has the potential to spur growth is to utilize endophytic bacteria. This study aims to describe the diversity of orchid endophytic bacteria that have the potential as growth promoters and biocontrol agents. Observation parameters include indole acetic acid (IAA) production, inorganic phosphate dissolution, ammonia production of orchid endophytic bacteria, and antagonism of endophytic bacteria to pathogenic bacteria that cause soft rot *in vitro*. The diversity of orchid endophytic bacteria was analyzed using rep-PCR with BOX-A1R primer. The results showed that 10 isolates of orchid endophytic bacteria were able to produce IAA with a concentration of 79–321 µg/mL, able to dissolve phosphate, and produce ammonia. In antagonism testing against soft rot-causing bacteria, all isolates were able to form an inhibitory zone with a diameter of 3–7.2 cm. Furthermore, diversity analysis using rep-PCR showed that isolates of endophytic bacteria DnPh5, BgCt2, BgVt10, DnLp7, DnB11, and DnAr4 had a uniform DNA band pattern so that they were grouped together. Meanwhile, isolates of TbPh7, lbtPhm1, DnDr2, and AkOc1 showed different DNA band patterns, indicating that the four isolates were different species or subspecies of bacteria. In dendrogram analysis, DnPh5, BgCt2, BgVt10, DnLp7, DnB11, and DnAr4 isolates have a similarity of 100%. The similarity of isolates lbtPhm1, DnDr2, and AkOc1 was 90%, 79%, and 68%, respectively, against the other six isolates. TbPh7 isolate is an isolate with a low level of similarity to other isolates, which is about 51%.

Keywords: orchid, endophytic bacteria, growth promoter, biocontrol agent, rep-PCR

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit yang menimbulkan masalah serius dan mengakibatkan turunnya produksi tanaman anggrek adalah penyakit busuk lunak (Wu *et al.* 2011; Suputra *et al.* 2022). Penyakit ini disebabkan oleh infeksi bakteri patogen yang menyerang bagian jaringan tanaman anggrek, antara lain dari genus *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Dickeya*,

¹ Program Studi Agroteknologi, STIPER Santo Thomas Aquinas, Jl. Akuatan-Kemiri I No.4, Papua 99352

² Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jalan Bulaksumur, Yogyakarta 55281

³ Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Bulaksumur, Yogyakarta 55281

* Penulis Korespondensi: Email: merylinggi@stipersta.ac.id

Burkholderia, dan *Erwinia*. Salah satu agensia hayati yang mendapat perhatian untuk mendorong pertumbuhan dan peningkatan ketahanan tanaman terhadap penyakit adalah bakteri endofit (Joko *et al.* 2018). Bakteri endofit dijumpai pada berbagai jaringan seperti biji, akar, batang, bunga, buah, dan daun (Hung *et al.* 2007) dan hidup di dalam jaringan tanaman selama separuh atau seluruh siklus hidupnya. Meskipun hidup dan berkolonisasi dalam jaringan tanaman, bakteri endofit diketahui tidak menimbulkan efek negatif bagi tanaman (Tanawy 2009; Frank *et al.* 2017).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa bakteri endofit mampu mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman dengan memproduksi berbagai fitohormon seperti asam indol-3-asetat (IAA), asam giberelin, dan asam absisat (Sgroy *et al.* 2009; Shi *et al.* 2009; Pan *et al.* 2020). Bakteri endofit juga mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi seperti nitrogen dan fosfat bagi pertumbuhan tanaman.

Untuk menginduksi ketahanan tanaman inangnya terhadap serangan patogen, bakteri endofit memproduksi enzim seperti peroksidase, kitinase, protease, β -1,3 glukonase, dan senyawa fenol (Harish *et al.* 2008), serta komponen antimikrob seperti etil isosalikolat (Shah *et al.* 2021). Kuldau dan Bacon (2007) melaporkan bahwa bakteri endofit mampu meningkatkan ketahanan tanaman terhadap stres abiotik kekeringan dengan menghasilkan senyawa-senyawa alkaloid seperti lolin alkaloid. Hal ini didukung oleh penelitian Tanawy (2009), bahwa keberadaan bakteri endofit Enterobacteriaceae mampu memfiksasi nitrogen dan meningkatkan pertumbuhan tanaman padi serta bertahan hidup pada kondisi lingkungan dengan kadar salinitas yang tinggi.

Bakteri endofit juga dapat diisolasi dari berbagai jaringan tanaman anggrek. Djatnika (2012) menunjukkan bahwa isolat B23, B26 dan B37 yang diisolasi dari anggrek *Dendrobium* dan *Phalaenopsis* berpotensi sebagai pengendali hayati terhadap penyakit layu Fusarium. Pada penelitian Nawangsih *et al.* (2009), *Bacillus substilis* B12 dan *Pseudomonas fluorescens* Pf10 mampu menekan *Erwinia carotovora* secara *in vitro*. Penggunaan *B. substilis* dan *P. fluorescens* dalam formulasi biopestisida cair efektif dalam menekan kejadian penyakit busuk lunak hingga 0%. Senada dengan hal tersebut, Alibandri *et al.* (2020) melaporkan berbagai spesies bakteri endofit seperti *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Fictibacillus*, dan *Bacillus* yang diisolasi dari berbagai organ anggrek Mediterania mampu memproduksi IAA, melarutkan berbagai nutrisi, dan dengan aktivitas enzim ACC deaminase. Dalam penelitiannya, Alibandri *et al.* (2020) juga melaporkan beberapa bakteri endofit *Pseudomonas* dapat menghambat pertumbuhan jamur *Tulasnella calospora* secara *in vitro*.

Untuk menganalisis keragaman genetik mikroorganisme secara molekuler telah dikembangkan

berbagai metode, contohnya RAPD, RFLP, AFLP, dan rep-PCR. Metode rep-PCR menjadi salah satu metode penapisan awal untuk menganalisis keragaman genetik organisme. Target amplifikasi pada teknik rep-PCR adalah sekuens nukleotida lestari (*conserved*) yang mengalami perulangan di sepanjang genom yang menjadi salah satu keunggulan dibandingkan metode analisis lainnya. Genersch dan Otten (2003) mengemukakan bahwa terdapat 3 satuan utama elemen berulang DNA yang sering digunakan untuk tujuan pemetaan genome bakteri. Ketiga elemen repetitif DNA tersebut ialah sekuens REP (*repetitive extragenic palindromic*), sekuens ERIC, dan sekuens BOX.

Berbagai penelitian menunjukkan potensi bakteri endofit sebagai agensia hayati pemacu peningkatan pertumbuhan dan ketahanan tanaman terhadap serangan penyakit. Oleh karena itu, perlu dianalisis kemampuan bakteri endofit anggrek dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan memproduksi IAA, amonia, dan pelarutan fosfat, di samping kemampuan meningkatkan ketahanan terhadap penyakit busuk lunak. Selanjutnya, keragaman bakteri endofit anggrek dianalisis berbasis keragaman bakteri endofit anggrek menggunakan metode repetitif PCR dengan primer BOX-AIR. Penelitian ini diharapkan memberi informasi terkait potensi bakteri endofit tanaman anggrek sebagai agensia hayati dan keragamannya secara genetik.

METODE PENELITIAN

Pengujian Produksi IAA pada 10 Bakteri Endofit Anggrek

Sepuluh isolat bakteri endofit anggrek *Phalaenopsis* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM, dimurnikan untuk mendapatkan koloni sel tunggal dengan teknik gores (*streak plate method*). Kemampuan produksi IAA kultur murni 10 isolat bakteri endofit diuji secara kolorimetrik (Gordon & Weber 1951). Kultur murni isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan dalam 5 mL media YPB (*yeast peptone broth*) yang telah ditambahkan L-triptofan (200 μ g/mL). Suspensi bakteri selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 5 menit. Sebanyak 100 μ L aliquot supernatan dicampur dengan 400 μ L reagen Salkowski dan dibiarkan pada suhu ruang selama 20 menit. Produksi IAA diamati dengan melihat pembentukan warna merah muda pada campuran alikout supernatan dan reagen Salkowski. Kultur bakteri endofit yang menunjukkan reaksi positif diseleksi untuk diuji secara kuantitatif dengan Elisa Reader. Absorbans pada panjang gelombang 550 nm digunakan untuk menentukan kuantitas IAA produksi bakteri endofit. Konsentrasi yang dihasilkan bakteri endofit ditentukan lewat perbandingan dengan kurva standar IAA.

Pengujian Kemampuan Bakteri Endofit dalam Melarutkan Fosfat

Pelarutan fosfat oleh bakteri endofit anggrek diuji dengan menumbuhkan isolat bakteri dalam media NBRIP padat dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar (Mehta & Nautiyal 2001). Pengujian ini diulang 3 kali untuk setiap isolat bakteri endofit. Terbentuknya zona jernih di sekitar koloni bakteri dinyatakan sebagai hasil yang positif.

Pengujian Produksi Amonia oleh Bakteri Endofit Anggrek

Produksi amonia bakteri endofit anggrek pada penelitian ini diuji menggunakan media *peptone water*. Isolat kultur murni bakteri endofit anggrek diinkubasikan dalam tabung reaksi berisi 5 mL media *peptone water* selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah isolat diinkubasi pada media *peptone water*, 0,25 mL reagen Nessler ditambahkan ke dalam suspensi. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media *peptone water* dari warna kuning sampai coklat.

Pengujian Antagonisme Bakteri Endofit terhadap Bakteri Busuk Lunak secara *In Vitro*

Bakteri busuk lunak yang digunakan pada uji ini adalah *Pectobacterium brasiliense*, koleksi Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM (Joko *et al.* 2019). Antagonisme bakteri endofit anggrek terhadap *P. brasiliense* diujikan terhadap 10 isolat bakteri endofit terseleksi. Pengujian dikerjakan dengan metode lapis ganda, yaitu 50 µL suspensi bakteri busuk lunak dimasukkan ke dalam 0,5% agar-agar (suhu 45°C) dan dituang di atas permukaan media YPA padat. Isolat bakteri endofit diinokulasi titik pada permukaan agar yang telah padat dan diinkubasikan selama 7 hari pada suhu ruang. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur untuk memperoleh isolat bakteri yang terbaik dalam menghambat bakteri busuk lunak.

Ekstraksi DNA Bakteri Endofit

Keragaman bakteri endofit terpilih dengan metode PCR repetitif (rep-PCR) dianalisis menggunakan primer BOX-AIR di Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Sebanyak 10 isolat bakteri endofit terseleksi diekstraksi total genom DNA-nya untuk analisis keragaman berdasarkan metode rep-PCR. Bahan yang digunakan untuk isolasi total genom DNA antara lain: bufer natrium tris EDTA (STE), lisozim, bufer lisis, kloroform isoamil alkohol (CI), fenol, Na-asetat, etanol absolut, etanol 70%, bufer TE, dan akuades. Isolat bakteri endofit ditumbuhkan pada media YPB (*yeast pepton buffer*) selama ± 24 jam dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit hingga diperoleh pelet (endapan sel). Total genom DNA bakteri diisolasi berdasarkan metode CTAB (William *et al.* 2012). Pelet

DNA diresuspensi dengan bufer TE sebanyak 20–40 µL dan disimpan pada –20°C.

Analisis Keragaman Genetik 10 Bakteri Endofit Berdasarkan rep-PCR

Bahan yang digunakan dalam proses amplifikasi rep-PCR antara lain: 1 µL DNA templat, 0,5 µL primer BOX-A1R 10 pmol(5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGcg-3') (Chung Hong *et al.* 2010), 12,5 µL GoTaq Green Master Mix 2x (Promega, USA), dan 11 µL ddH₂O. Siklus PCR selama 35 siklus mengikuti prosedur penelitian Gensch dan Otten (2003). Selanjutnya, campuran PCR yang telah homogen dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* dengan formula waktu sebagai berikut: predenaturasi 95°C selama 15 menit diikuti denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 53°C selama 1 menit, elongasi pada 72°C selama 2,5 menit, serta pasca-elongasi pada 72°C selama 10 menit. Reaksi PCR dikerjakan dalam 30 siklus.

Dari hasil produk rep-PCR, diambil 5 µL dan dijalankan pada gel agarosa (1%) elektroforesis dalam TBE 1x selama 70 menit pada 70 V. Setelah prosedur elektroforesis, pita DNA diwarnai dengan ETBR (etidium bromida) dan divisualkan dengan kamera digital. Berdasarkan pita hasil elektroforesis, data biner (0–1) ditentukan dan dianalisis menggunakan peranti lunak NTSYS 2.0 untuk mendeskripsikan matriks similaritas serta analisis kluster. Kluster dari matriks similaritas digambarkan menggunakan program UPGMA yang terdapat di dalam NTSYS 2.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi IAA oleh Bakteri Endofit

Pada pengujian produksi IAA, 10 bakteri endofit membentuk warna merah muda pada supernatan setelah ditambahkan reagen. Hasilnya dibaca dengan ELISA Reader dan kesepuluh bakteri endofit tersebut memproduksi IAA dengan konsentrasi yang berbeda, pada rentang 79–321 µg/mL (Tabel 1). Konsentrasi IAA tertinggi diproduksi oleh bakteri AkOc1 321 µg/mL, diikuti oleh bakteri DnLp7 267 µg/mL, dan terendah pada bakteri TbPh7 79 µg/mL.

Warna merah supernatan terbentuk setelah diberi reagen Salkowski, mengindikasikan keberadaan senyawa indol pada supernatan. Hal ini karena reagen Salkowski merupakan pereaksi untuk mendeteksi keberadaan indol. Ini membuktikan bahwa mikro-organisme yang berasosiasi dengan tanaman, termasuk bakteri endofit, juga mampu menghasilkan IAA (Tsavkelova *et al.* 2007; Jha & Kumar, 2007; Tanawy, 2009). Beberapa jalur produksi IAA pada bakteri, yaitu jalur indol-3-asetamida (IAM), indol-3-piruvat (IPyA), triptamin (TAM), triptofan-*independent*, *tryptophan side-chain oxidase* (TSO), dan indol-3-asetonitrie (IAN) sudah dikemukakan oleh Spaepen *et al.* (2007).

Kemampuan isolat bakteri endofit anggrek untuk memproduksi IAA pada penelitian ini dipacu dengan pemberian substrat triptofan pada media pembiakan sebagai prekursor. Spaepen *et al.* (2007) menyatakan bahwa triptofan merupakan prekursor pada pembentukan IAA baik untuk tanaman maupun mikroorganisme. Beberapa gen spesies bakteri yang telah disekuens dan berperan dalam konversi triptofan menjadi IAA adalah triptofan monooksigenase, indol-3-asetamida hidrolase, indol-3-piruvat dekarboksilase, dan tiramina oksidase. Triptofan merupakan salah satu eksudat yang dikeluarkan tanaman dan dibutuhkan mikroorganisme sebagai sumber N. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bakteri endofit anggrek mampu memproduksi IAA dengan prekursor triptofan sehingga dapat memacu pertumbuhan tanaman.

Pelarutan Fosfat oleh Bakteri Endofit

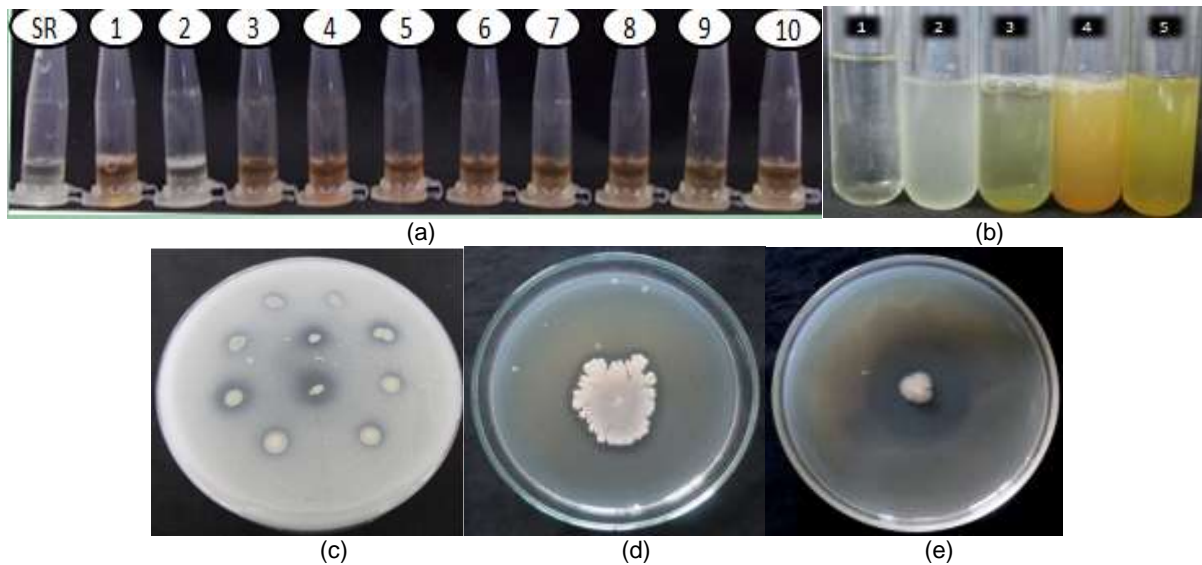
Hasil pengujian pelarutan fosfat oleh bakteri endofit anggrek pada Tabel 1 menunjukkan bahwa bakteri endofit mampu melarutkan fosfat dan berkemampuan

tertinggi pada isolat TbPh7. Kemampuan melarutkan fosfat oleh isolat bakteri endofit pada penelitian ini ditandai dengan keberadaan zona bening di sekitar koloni bakteri di atas permukaan media (Gambar 1). Zona bening yang terbentuk dapat disebabkan oleh sel bakteri endofit yang mampu melarutkan senyawa fosfat anorganik menjadi senyawa fosfat organik. Menurut Ngamau *et al.* (2012), pembentukan halo (zona bening) di sekitar koloni bakteri endofit pada media NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate*) mengindikasikan keberadaan produksi asam organik dan asam karboksilat oleh bakteri endofit tersebut. Asam organik dan karboksilat yang disintesis bakteri tersebut dapat mengganti ion PO_4^{3-} dan berikatan dengan Ca^{+} , Fe^{3+} , dan Al^{3+} , sehingga fosfat dapat diserap oleh tanaman (Gyaneshwar *et al.* 2002; Henri *et al.* 2008; Vitorino *et al.* 2012). Pembentukan zona bening pada media NBRIP dapat mengindikasikan isolat bakteri endofit anggrek pada penelitian ini mampu menghasilkan enzim fitase, yaitu enzim yang mampu menghidrolisis fitat (Gyaneshwar *et al.* 2002). Pi (fitat) merupakan bentuk P yang paling

Tabel 1 Daftar isolat bakteri endofit yang digunakan untuk analisis keragaman genetik dengan teknik rep-PCR

Isolat	Gram	Produksi IAA (µg/mL)	Diameter zona bening pada uji pelarutan fosfat (mm)	Produksi amonia	Zona hambat (cm) pada uji antagonis
DnPh5	-	153	2,0	+	3,8
TbPh7	+	79	4,5	+++	7,2
IbtPhm1	-	130	3,0	++	5,0
BgCt2	-	132	1,5	+++	4,5
BgVt10	-	157	1,5	++	5,2
DnDr2	-	249	2,0	+	7,0
DnLp7	-	267	1,5	++	3,8
DnBI1	-	201	1,0	+	4,4
AkOc1	-	321	2,0	+	3,0
DnAr4	-	188	1,5	+	4,4

Keterangan: + = positif memproduksi amonia; pengujian Gram dilakukan dengan uji KOH.



Gambar 1 Pengujian yang dilakukan pada isolat bakteri endofit : A. Produksi IAA: SR (Salkowski Reagent), 1 – 10 isolat bakteri endofit sesuai Tabel 1; B. Produksi amonia : 1. Peptone water, 2. Inkubasi bakteri, 3. Peptone water + Nessler reagent, 4. Isolat TbPh7, 5. Isolat IbtPhm1; C. Pelarutan fosfat; D – E. Antagonisme terhadap bakteri busuk lunak secara in vitro.

mudah diakses oleh tanaman. Oleh karena itu, kehadiran mikroorganisme pelarut fosfat sangat penting guna mendukung penyerapan fosfat dalam bentuk Pi oleh tanaman.

Produksi Amonia oleh Bakteri Endofit

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua isolat bakteri endofit yang diinkubasikan dalam media pepton cair bereaksi positif (terbentuknya warna kuning) setelah ditambahkan reagen Nessler. Pada penelitian ini, kandungan asam amino dalam media pepton memungkinkan bakteri endofit mengonversi N menjadi amonia sehingga dapat dideteksi setelah reagen Nessler ditambahkan. Keberadaan amonia dideteksi dengan terbentuknya warna kuning pada larutan pepton; pada konsentrasi amonia yang tinggi akan terbentuk warna cokelat.

Nitrogen merupakan unsur makronutrien esensial yang sangat dibutuhkan oleh tanaman tetapi tanaman hanya dapat menggunakan unsur N dalam bentuk amonia (NH₄)⁺ dan nitrat (NO₃)⁻. Unsur nitrogen yang dibutuhkan tanaman diperoleh berkat bantuan mikroorganisme termasuk bakteri endofit. Bakteri endofit diketahui mampu memfiksasi N bebas dari udara dan mengubahnya ke dalam bentuk yang tersedia bagi tanaman (Khan *et al.* 2012; Gayathri *et al.* 2010; Stajkovic *et al.* 2009). Produksi amonia oleh bakteri endofit dimungkinkan karena keberadaan enzim nitrogenase yang berfungsi dalam konversi N₂ menjadi NH₄⁺ (Jha & Kumar 2007). Secara garis besar, tanaman lebih membutuhkan nitrat dibandingkan amonia. Akan tetapi, menurut Ramyasmruthi *et al.* (2012), amonia yang diproduksi oleh bakteri secara tidak langsung mampu memengaruhi peningkatan pertumbuhan tanaman.

Antagonisme Bakteri Endofit terhadap Bakteri Penyebab Busuk Lunak Secara *In Vitro*

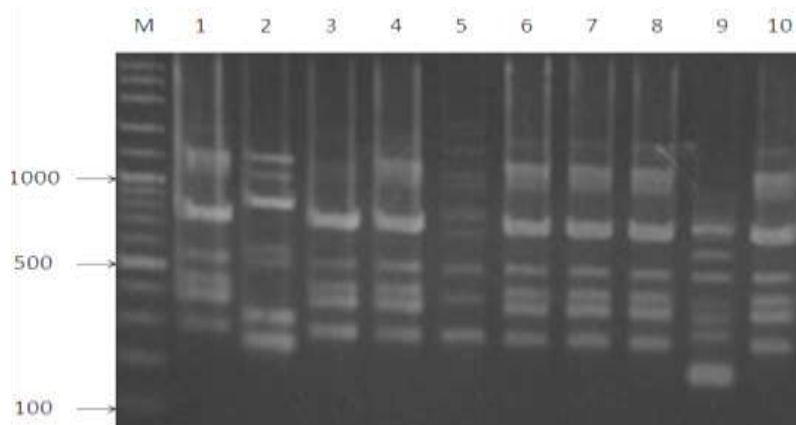
Pada penelitian ini, pengendalian bakteri endofit terhadap bakteri penyebab penyakit busuk lunak pada angrek diuji secara *in vitro*. Hasil uji antagonisme bakteri endofit terhadap bakteri *Pectobacterium brasiliense* disajikan pada Tabel 1. Hasil positif ditandai

dengan terbentuknya zona hambat pada lapisan agar-agar yang dicampur dengan suspensi bakteri busuk lunak *P. brasiliense*. Pada penelitian ini terlihat bahwa kesepuluh isolat bakteri mampu membentuk zona hambat terhadap isolat bakteri *P. brasiliense* dengan kisaran diameter 3–7,2 cm. Zona hambat terkecil diperlihatkan oleh isolat AkOc1, yaitu 3 cm. Zona hambat yang terbesar dicapai oleh isolat bakteri endofit TbPh7, diikuti isolat DnDr2.

Pembentukan zona hambat diindikasikan sebagai kemampuan isolat bakteri endofit tersebut untuk berkompetisi dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Gambar 1). Kemampuan bakteri endofit menghasilkan berbagai enzim dan metabolit sekunder mendukung penghambatan pertumbuhan bakteri patogen sehingga dapat meningkatkan ketahanan tanaman. Shin *et al.* (2007) menemukan beberapa bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman pantai mampu menghasilkan enzim hidrolisis protease, pektinase, kitinase, serta metabolit sekunder siderofor. Lebih lanjut, pada pengujian aktivitas antagonis terhadap 4 isolat jamur fitopatogen (*Rhizoctonia solani*, *Phytophthora ultium*, *Fusarium oxysporum*, dan *Botrytis cinerea*) secara *in vitro*, sebagian besar bakteri endofit tersebut mampu menunjukkan hasil positif. Hasil uji antagonisme pada penelitian ini sebanding dengan penelitian He *et al.* (2009) bahwa bakteri endofit EBLQ1 *Phyllobacterium sp.* mampu menghambat 14 galur jamur fitopatogen (di antaranya *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotium*, dan *Verticillium dahlia*) serta satu galur bakteri fitopatogen. Temuan Djatnika (2012) menunjukkan isolat B23, B26, dan B37 mampu menekan pertumbuhan *F. oxysporum* dalam media PDA. Bahkan ketiga isolat tersebut mampu menekan intensitas penyakit layu *Fusarium* dan jumlah tanaman angrek yang terserang.

Keragaman Genetik 10 Bakteri Endofit Berdasarkan rep-PCR

Pada penelitian ini, keragaman genetik bakteri endofit angrek dianalisis menggunakan metode PCR repetitif. Keragaman genetik bakteri endofit terdeteksi



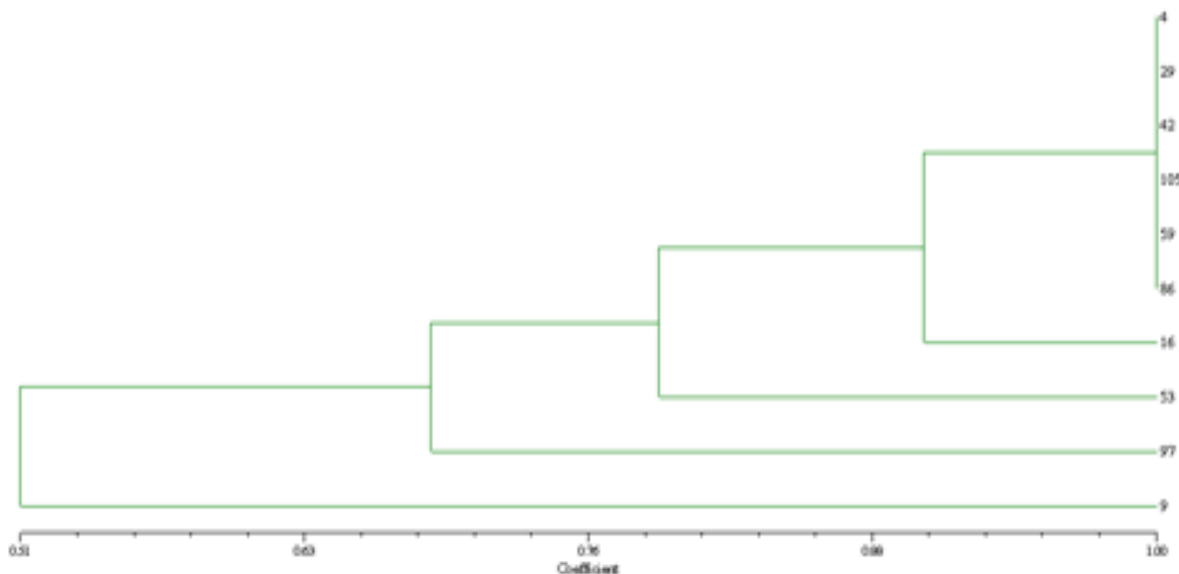
Gambar 2 Keragaman genotipe 10 isolat bakteri endofit berdasarkan rep-PCR menggunakan primer BOX-A1R. M = penanda DNA 1kb; 1 = isolat DnPh5; 2 = isolat TbPh7; 3 = isolat lbtPhm1; 4 = isolat BgCt10; 5 = isolat DnDr2; 6 = isolat Bgvt10; 7 = isolat DnLp7; 8 = isolat DnBl1; 9 = isolat Akoc1; 10 = isolat DnAr4

dalam 10 isolat bakteri endofit anggrek. Pada Gambar 2 divisualkan amplikon 10 isolat bakteri endofit dengan menggunakan metode rep-PCR berkisar pada 200 hingga 1200 bp. Visualisasi hasil elektroforesis amplikon rep-PCR 10 isolat bakteri endofit menunjukkan 5 pola pita DNA yang berbeda. Keragaman jumlah pita DNA setiap isolat yang terbentuk menggunakan primer BOX-A1R pada rep-PCR berkisar antara 5 dan 9 pita DNA. Isolat bakteri endofit DnPh5, BgCt2, BgVt10, DnLp7, DnBl1, dan DnAr4 menunjukkan pola pita DNA yang seragam sehingga dikelompokkan ke dalam satu kelompok. Sebaliknya, isolat TbPh7, lbtPhm1, DnDr2, dan AkOc1 menunjukkan pola pita DNA yang berbeda-beda sehingga mengindikasikan keempat isolat tersebut merupakan spesies ataupun subspecies bakteri yang berbeda. Dengan demikian, metode rep-PCR merupakan salah satu metode analisis keragaman genetik spesies sampai tingkat subspecies dengan akurasi tinggi (Yang *et al.* 2004; Torres *et al.* 2008). Menurut Tobes dan Pareja (2006), sekuens repetitif (REP *sequences*) meliputi sekuens-sekuens yang bersifat palindromik dan berulang pada daerah genom ekstrasenik bakteri dengan panjang basa sekitar 21–65 basa. Dengan metode rep-PCR, penentuan spesies bakteri hingga ke tingkat strain sangat dimungkinkan berdasarkan hasil amplifikasi elemen DNA yang berulang (Genersch & Otten 2003). Lebih lanjut, dikemukakan terdapat 3 satuan utama elemen repetitif DNA yang sering digunakan untuk pemetaan genom bakteri. Teknik rep-PCR menggunakan primer BOX-A1R dengan target sekuens DNA repetitif yang lestari pada subunit BOXA genom bakteri. Sekuens subunit boxA-like merupakan sekuens dengan tingkat lestari yang tinggi bila dibandingkan subunit boxB dan boxC pada elemen BOX genom bakteri.

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis, pita-pita setiap isolat tersebut dianalisis menggunakan peranti lunak NTSYS dengan metode pengelompokan UPGMA. Gambar 3 memperlihatkan dendrogram menggunakan peranti tersebut yang menunjukkan persentase tingkat keseragaman antar-isolat. Pada dendrogram terlihat bahwa isolat DnPh5, BgCt2, BgVt10, DnLp7, DnBl1, dan DnAr4 mempunyai similaritas 100%. Selanjutnya, isolat lbtPhm1, DnDr2, dan AkOc1 masing-masing mempunyai similaritas 90%, 79%, 68% terhadap keenam isolat lainnya. Isolat TbPh7 merupakan isolat dengan tingkat similaritas paling rendah terhadap isolat lainnya, yaitu sekitar 51%.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini, sepuluh bakteri endofit mampu memproduksi IAA dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi IAA tertinggi diproduksi oleh bakteri AkOc1 321 µg/mL diikuti oleh bakteri DnLp7 267 µg/mL, dan terendah pada bakteri TbPh7 79 µg/mL. Isolat bakteri TbPh7 dan bakteri lbtPhm1 berpotensi sebagai agens hayati karena menunjukkan respons yang paling positif dibandingkan dengan isolat bakteri lainnya dalam pengujian produksi ammonia, pelarutan fosfat, dan antagonisme terhadap bakteri busuk lunak. Hasil analisis keragaman dengan metode rep-PCR menunjukkan isolat bakteri TbPh7, bakteri AkOc1, bakteri DnDr2, dan bakteri lbtPhm1 memiliki pola pita DNA yang berbeda-beda dengan tingkat similaritas 51%, 68%, 79% dan 90% terhadap isolat bakteri lainnya.



Gambar 3 Dendrogram hasil analisis pengelompokan berdasarkan UPGMA yang menunjukkan keragaman genetik 10 isolat bakteri endofit. EA 4 = isolat DnPh5, EA 29 = isolat BgCt2, EA 42 = isolat BgVt10, EA 105 = isolat DnAr4, EA 59 = DnLp7, EA 86 = isolat DnBl1, EA 16 = isolat lbtPhm1, EA 53 = isolat DnDr2, EA 97 = isolat AkOc1, EA 9 = isolat TbPh7

DAFTAR PUSTAKA

- Alibandri P, Monaco NL, Calevo J, Voyron S, Puglia AM, Cardinale M, Perotto S. 2020. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes from three terrestrial mediterranean orchids species. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*. 155(6): 1153–1164. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1829731>
- Djatnika I. 2012. Seleksi bakteri antagonis untuk mengendalikan layu Fusarium pada tanaman Phalaenopsis. *Jurnal Hortikultura*. 22(3): 276–284. <https://doi.org/10.21082/jhort.v22n3.2012.p276-284>
- Chun-Hong L, Ming-Wen Z, Can-Ming T, Shun-Peng L. 2010. Population dynamics and identification of endophytic bacteria antagonistic toward plant-pathogenic fungi in cotton root. *Microbiological Ecology*. 344–356. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9570-4>
- Frank AC, Guzmán JPS, Shay JE. 2017. Transmission of bacteria endophytes. *Microorganism*. 5(70). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Gayathri S, Saravanan D, Radhakrishnan M, Balagurunathan R, Kathiresan K. 2010. Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and salt-marsh plant species. *Indian Journal of Biotechnology*. 9: 397–402.
- Genersch E, Otten C. 2003. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*. 34: 195–206 <https://doi.org/10.1051/apido:2003025>
- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. 2002. Role of Soil Microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. 245: 83–93. <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>
- Harish S, Kavino M, Kumar N, Saravanakumar D, Soorianathasundaram K, Samiyappan R. 2008. Biohardening with plant growth promoting Rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana Bunchy Top Virus. *Applied Soil Ecology*. 39: 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.006>
- He RL, Wang GP, Liu XH, Zhang ZL, Lin FC. 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *African Journal of Biotechnology*. 8(2): 191–195.
- Henri F, Laurette NN, Annette D, John Q, Wolfgang M, François-Xavier E, Dieudonné N. 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. *African Journal of Microbiology Research*. 2: 171–178.
- Hung PQ, Kumar SM, Govindsamy V, Annapurna K. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biol. Fertil. Soils*. 155–162. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0189-7>
- Jha PN, Kumar A. 2007. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03383.x>
- Joko T, Anggraeni DN, Irianti M, Daryono BS, Widada J, Subandiyah S. 2018. Bacterial endophytes isolated from orchids and their influence on plant health. *Proceedings of International Symposium on Innovative Crop Protection for Sustainable Agriculture*, Gifu University, Japan (JP): 7–8th March 2018. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201037>
- Joko T, Soffan A, Rohman MS. 2019. A novel subspecies-specific primer targeting the gyrase B gene for the detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. *Biodiversity*. 20(10): 3042–3048. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201037>
- Khan Z, Guelich G, Phan H, Redman R, Doty S. 2012. Bacterial and yeast endophytes from Poplar and Willow promote growth in crop plants and grasses. *ISRN Agronomy*. Article ID 890280. International Scholarly Research Network. <https://doi.org/10.5402/2012/890280>
- Kuldau G, Bacon C. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*. 46: 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.023>
- Mehta S, Nautiyal CS. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*. 43: 51–56. <https://doi.org/10.1007/s002840010259>
- Nawangsih AA, Hanudin, Sanjaya L, Cahyono B. 2010. Pengendalian *Erwinia carotovora* pada Anggrek Menggunakan Biopestisida Mikrobial Berbahan Aktif *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Laporan Akhir. Bogor (ID): KKP3T TA 2009
- Ngamau CN, Matiru VN, Tani A, Muthuri CW. 2012. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African Journal of Microbiology Research*. 6(34): 6414–6422. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1170>
- Pan L, Chen J, Ren S, Shen H, Rong B, Liu W, Yang Z. 2020. Complete genome sequence of *Mycobacterium Mya-zho1*, an endophytic

- bacterium, promotes plant growth and seed germination isolated from flower stalk of *Doritaenopsis*. *Archives of Microbiology*. 202: 1965–1976. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01924-w>
- Ramyasmruthi S, Pallavi O, Pallavi S, Tilak K, Srividya, S. 2012. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae Rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2(1): 16–24.
- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitch A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2261–2268. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2261-2268.2002>
- Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Florencia M, Papa D, Lagares A. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology*. 371–381. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>
- Shah S, Chand K, Rekadwad B, Shouche YS, Sharma J, Pant B. 2021. A prospectus of plant growth promoting endophytic bacterium from orchid (*Vanda cristata*). *BMC Biotechnology*. 21: 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00676-9>
- Shi Y, Lou K, Li C. 2009. Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biology and Fertility of Soils*. 645–653. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0376-9>
- Shin DS, Park MS, Jung S, Lee MS, Lee KH, Bae KS, Kim SB. 2007. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. *Journal Microbiology Biotechnology*. 17(8): 1361–1368.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans S. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stajković O, De Meyer S, Miličić B, Willems A, Deliđ D. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botanica Serbica*. 33(1): 107–114.
- Suputra IPW, Wirya GNAS, Sari NBK, Temaja IGRM, Innosensia NLPC. 2022. Identification and characterization of soft rot bacterial pathogen on *Phalaenopsis* orchids in Bali. *Cropsaver: Journal of Plant Protection*. 5(1): 1–6. <https://doi.org/10.24198/cropsaver.v5i1.39284>
- Tanawy EA. 2009. Acquainting with salt tolerant endophytic bacteria isolated from rice. *Plant Grown*. 1(2): 72–79.
- Tobes R, Pareja E. 2006. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics*. 7–62. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-62>
- Torres AR, Araujo WL, Cursino L, Hungria M, Plotegher F, Mostasso FL, Azevedo JL. 2008. Diversity of enterobacteria associated with different host plant. *The Journal of Microbiology*. 46 (4): 373–379. <https://doi.org/10.1007/s12275-007-0165-9>
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*: 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.014>
- Vitorino LC, Silva FG, Soares MA, Souchie EL, Costa AC, Lima WC. 2012. Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of Indoleacetic acid by endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). *International Research Journal of Biotechnology*. 3(4): 47–54.
- Wu PH, Huang DD, Chang DCN. 2011. Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. *African Journal of Biotechnology*. 10: 10095–10100.
- Yang HH, Vinopal RT, Grasso D, Smets BF. 2004. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1528–1536. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1528-1536.2004>