



## KEMAMPUAN BAKTERI ENDOFIT PELARUT FOSFAT DARI TUMBUHAN AKAR KUNING (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) ASAL PULAU ENGGANO, PROVINSI BENGKULU

### THE ABILITY OF ENDOPHYTIC POSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA OF YELLOW ROOT PLANT (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) FROM ENGGANO ISLAND, BENGKULU PROVINCE

Risky Hadi Wibowo<sup>1,2,3\*</sup>, Stella Reformanda Sembiring<sup>1</sup>, Sipriyadi<sup>1,2</sup>, Welly Darwis<sup>1</sup>,  
Rochmah Supriyati<sup>1</sup>, Thoriqul Hidayah<sup>2</sup>, Sal Prima Yudha S<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Kampus UNIB Kandang Limun, Bengkulu 38112, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Kampus UNIB Kandang Limun, Bengkulu 38112, Indonesia

<sup>3</sup>PUI Research Centre of Sumatera Natural Products and Functional Materials (RC SUNAFPUMA), Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Bengkulu, Kandang Limun, Bengkulu 38112, Indonesia

<sup>4</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Kampus UNIB Kandang Limun, Bengkulu 38112, Indonesia

Corresponding author: [riskyhadiwibowo80@gmail.com](mailto:riskyhadiwibowo80@gmail.com)

Naskah Diterima: 4 Oktober 2020; Direvisi: 12 Agustus 2021; Disetujui: 12 Juni 2022

#### Abstrak

Fosfor merupakan salah satu unsur makro nutrien yang dibutuhkan untuk perkembangan tumbuhan dan dapat dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat. Namun, keberadaan fosfat dalam tumbuhan tidak dapat digunakan oleh tumbuhan itu sendiri, sehingga dibutuhkan bantuan bakteri endofit yang berperan sebagai agen pemacu pertumbuhan tanaman yang dapat melarutkan fosfat pada tumbuhan, khususnya tumbuhan akar kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) yang tumbuh liar di Pulau Enggano, Provinsi Bengkulu. Tujuan penelitian ini untuk memperoleh bakteri endofit yang dapat melarutkan fosfat. Isolasi dilakukan dengan metode sterilisasi permukaan, menggunakan alkohol 70% dan natrium hipoklorit 5,25% lalu ditempelkan di media NA. Isolat yang diperoleh kemudian diuji kemampuan melarutkan fosfat dengan digoreskan ke media Pikovskaya, lalu diukur zona bening. Hasil penelitian menunjukkan dari 18 isolat bakteri endofit, 8 di antaranya dapat melarutkan fosfat. Isolat AKE15 dan AKE18 memiliki kemampuan lebih tinggi untuk melarutkan fosfat dengan indeks pelarut fosfat (IP)  $\pm 1,59$  dan  $\pm 1,01$ . Identifikasi berdasarkan pewarnaan Gram dan uji biokimia dari 8 isolat bakteri endofit pelarut fosfat (BPF) memiliki kedekatan dengan 4 genus, yaitu *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, dan *Morococcus*.

**Kata kunci:** Akar kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr); Bakteri pelarut fosfat; Endofit; Pulau Enggano

#### Abstract

Phosphorus is one of the macronutrients required for plant development and produced by phosphate solubilizing bacteria. However, plants are unable to utilize phosphate themselves, thus they need the help of endophytic bacteria that play role as plant growth-promoting with ability to solubilize phosphates in plants, particularly in yellow root plants (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) that grow wildly in Enggano Island, Bengkulu Province. The research aimed to obtain endophytic bacteria that can solubilize phosphate. Isolation of endophytic bacteria was carried out by surface sterilization method using 70% alcohol and 5.25% sodium hypochlorite to be further placed on Nutrient Agar (NA) media. The isolates obtained were further tested for their ability to solubilize phosphate by streaking the isolate on Pikovskaya media and measuring the clear zones formed. The results showed that 8 out of 18 endophytic bacterial isolates were able to solubilize phosphate. Endophytic isolates of AKE15 and AKE18 were found to have higher ability to solubilize phosphate with a phosphate solubilizing index (IP) of about  $\pm 1.59$  and  $\pm 1.01$ , respectively. Identification based on Gram staining and biochemical tests indicated that 8 endophytic bacterial solubilizing isolates were closely related to 4 genera, namely *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, and *Morococcus*.

**Keywords:** Endophyte; Enggano island; Phosphate solubilizing bacteria; Yellow root plan (*Arcangelisia flava* (L.) Merr)

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v15i2.17632>

## PENDAHULUAN

Akar kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) merupakan tumbuhan liana dari familia *Menispermaceae* yang termasuk ke dalam salah satu dari 545 jenis tumbuhan di Pulau Enggano (Maryanto et al., 2015). Beberapa tahun ini, penggalian sumber daya mikroba, yakni bakteri yang terdapat dalam jaringan vaskuler mulai banyak dilakukan penelitian salah satunya tumbuhan akar kuning. Hubungan simbiosis bakteri endofit dan tanaman dapat bersifat netral, mutualisme, dan komensalisme (Bacon & Hinton, 2006).

Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup di jaringan vaskuler tumbuhan tanpa menyebabkan penyakit pada tumbuhan inangnya (Desriani et al., 2014). Selain itu, dilaporkan juga bahwa mikroba endofit secara alami merupakan bagian dari tanaman sehat (Yulianti, 2012). Bakteri endofit telah banyak digunakan sebagai pengendali hayati. Keunggulan bakteri endofit juga mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi, menghasilkan hormon pertumbuhan, mengendalikan penyakit tanaman, sintesis protein protease serta melarutkan fosfat sehingga mampu menyediakan unsur fosfat bagi tanaman (Harni et al., 2007).

Keberadaan unsur fosfor sangat dibutuhkan oleh tumbuhan dan termasuk dalam kelompok unsur hara makro yang penting bagi pertumbuhan tumbuhan. Namun, fosfor tidak tersedia di dalam tumbuhan sehingga tidak dapat digunakan untuk kebutuhan metabolismenya. Agar unsur fosfor dapat digunakan oleh tumbuhan, maka memerlukan bantuan mikroorganisme yang dapat melarutkan fosfat, sehingga penggunaan fosfat oleh tumbuhan dapat meningkat (Khan et al., 2007).

Bakteri endofit juga dapat berperan sebagai *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB) yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan meningkatkan ketersediaan nutrisi (Glickman & Dessaux, 1995). Beberapa bakteri pelarut fosfat (BPF) mampu melarutkan fosfat dengan melepaskan senyawa P melalui mekanisme pembentukan khelat, reaksi pertukaran, dan produksi asam organik (Chen et al., 2006).

Penelitian tentang bakteri pelarut fosfat yang berasal dari bakteri endofit telah banyak dilakukan. Penelitian Fadhilah et al. (2015) melaporkan dari 24 isolat bakteri endofit yang diisolasi dari kulit batang tumbuhan raru (*Cotylelobium melanoxylon*) diperoleh 2 isolat yang mampu melarutkan fosfat. Bakteri endofit yang dapat melarutkan fosfat juga diisolasi dari tumbuhan pisang (*Musa* sp.) dan diperoleh 40 isolat, 27 di antaranya dapat melarutkan fosfat (Matos et al., 2017). Tanaman bawang merah (*Allium cepa* L.) yang diisolasi dan diperoleh 230 isolat bakteri endofit, 31 di antaranya dapat melarutkan fosfat (Wandita et al., 2018). Namun, sejauh ini belum ada penelitian terkait bakteri endofit yang dapat melarutkan fosfat dari tumbuhan akar kuning asal Pulau Enggano.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari tumbuhan akar kuning asal Pulau Enggano dan menyeleksi bakteri endofit yang efektif berpotensi sebagai PGPB serta melakukan karakterisasi terhadap isolat bakteri endofit terpilih. Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh isolat-isolat yang bisa menjadi agen hayati unggulan untuk pertanian dengan penggunaan bakteri endofit dan memberikan informasi pemanfaatan bakteri endofit yang berpotensi sebagai PGPB.

## MATERIAL DAN METODE

### Koleksi Sampel

Tumbuhan akar kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) dikoleksi pada Agustus 2020 di Desa Malakoni, Kecamatan Enggano, Kabupaten Bengkulu Utara Pulau Enggano, dengan cara mengambil bagian akar, batang, dan daun akar kuning. Kemudian, sampel disimpan ke dalam plastik dan dihindari dari keadaan basah untuk mencegah tumbuhnya jamur pelapukan akar kuning.

### Isolasi Bakteri Endofit

Akar kuning dalam kondisi segar dicuci, lalu dipotong dengan ukuran 1–3 cm, kemudian dilakukan proses sterilisasi permukaan. Potongan sampel direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit. Lalu, dipindahkan ke dalam cairan natrium hipoklorit 5,25% selama 5 menit. Setelah itu, cairan diganti dengan alkohol 70% sebanyak 3 kali dengan interval waktu 30 detik dan dibilas dengan air steril mengalir secara perlahan. Sampel yang telah steril dicacah secara steril lalu ditanam pada media NA yang telah ditambahkan nistatin (0,01 % b/v) dan diinkubasi pada suhu 25–

30 °C selama  $\pm$  5 hari. Media yang sudah mengandung sampel tersebut diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap dan diamati setiap hari sampai ada pertumbuhan koloni. Bakteri endofit yang tumbuh dimurnikan satu per satu dan dipreservasi dalam agar miring (Radu & Kqueen, 2002).

### **Pemurnian Bakteri Endofit**

Koloni bakteri endofit yang telah tumbuh, kemudian dimurnikan kembali pada media NA. Pemurnian dilakukan dengan cara diambil sebanyak 1 ose dari isolat untuk selanjutnya diinokulasikan pada medium NA, kemudian diinkubasi suhu 37 °C selama 24 jam.

### **Karakterisasi Isolat Bakteri Endofit**

Isolat bakteri endofit yang telah murni kemudian diidentifikasi berdasarkan pengamatan makroskopis atau morfologi koloni meliputi bentuk, permukaan, penampakan, warna koloni atas dan bawah, tepi serta elevasi koloni bakteri (Jutono et al., 1978). Selain itu, kultur sel diwarnai dengan prosedur pewarnaan Gram mengikuti Pelczar dan Chan (2005) untuk diamati reaksi Gram.

Komposisi pembuatan media Pikovskaya yaitu untuk 1.000 mL diperlukan NaCl 0,1 g, glukosa 10 g,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  0,5 g, KCl 0,2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g, ekstrak khamir 0,5 g, agar 20 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,002 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,002 g,  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  5 g, dan dilarutkan dengan akuades 1.000 mL. Lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 15 lbs.

### **Pengujian Aktivitas Pelarut Fosfat Bakteri Endofit**

Isolat bakteri endofit yang telah didapat digunakan untuk pengujian aktivitas melarutkan fosfat pada media Pikovskaya. Satu ose isolat bakteri endofit ditotolkan ke media Pikovskaya dengan menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 4–7 hari pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi zona bening yang terdapat di sekeliling koloni diamati dan diukur indeks pelarutan fosfat (IP) (Premono et al., 1996). Rumus perhitungan indeks pelarutan fosfat (IP), yaitu diameter zona bening dikurangi diameter koloni dibagi diameter koloni.

### **Identifikasi Isolat dengan Uji Biokimia**

Tahap identifikasi berdasarkan karakter isolat bakteri yang telah diperoleh mengacu pada buku acuan identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Uji biokimia yang dilakukan terdiri atas uji gula-gula, motilitas, sitrat, katalase, dan urease. Uji gula-gula dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media uji, yaitu media glukosa (I), maltosa (II), sukrosa (III), dan laktosa (IV). Media dibuat di dalam tabung reaksi yang sebelumnya telah diberi tabung durham. Satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas di dalam tabung durham dan perubahan warna menjadi kuning keruh (Lay, 1994).

Uji motilitas dilakukan dengan menggunakan media NA 1% (semi solid). Kemudian satu ose isolat ditusukkan secara tegak lurus ke dalam media. Lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya sebaran pada daerah bekas tusukan. Uji sitrat dilakukan dengan menggunakan media *Simon Citrate Agar* (SCA) di dalam tabung reaksi yang telah dimiringkan lalu satu ose isolat ditusukkan secara tegak lurus ke dalam media. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru.

Uji katalase dilakukan dengan 1 ose isolat bakteri ditetesi dengan menggunakan larutan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) di atas kaca preparat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas pada permukaan koloni. Uji urease dilakukan dengan menggunakan media urea yang tidak disterilkan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah steril. Lalu satu ose isolat bakteri diguncangkan di dalam media. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil positif yang diperoleh berupa perubahan media menjadi warna merah muda.

### **Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kualitatif berdasarkan karakteristik morfologi koloni, pewarnaan Gram, dan karakteristik biokimia. Hasil pewarnaan Gram serta uji biokimia yang

diperoleh kemudian diidentifikasi dengan menggunakan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9<sup>th</sup> Edition (Holt et al., 1994) untuk melihat genus isolat bakteri yang diperoleh. Data hasil pengukuran diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk dihitung sebagai indeks pelarut fosfat.

## HASIL

### Perhitungan Koloni dan Karakterisasi Isolat Bakteri Endofit Secara Morfologi

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh beberapa isolat bakteri endofit dari tumbuhan akar kuning asal Pulau Enggano, Kecamatan Enggano, Kabupaten Bengkulu Utara, Bengkulu. Hasil isolasi bakteri endofit dari organ akar, batang serta daun dari tumbuhan akar kuning diperoleh sebanyak 44 isolat dengan 19 isolat endofit dari organ akar, 16 dari batang, dan 9 dari daun (Tabel 1).

**Tabel 1.** Perhitungan koloni bakteri endofit yang diisolasi dari tumbuhan akar kuning

Asal sampel	Jumlah koloni					Total koloni
	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	U <sub>4</sub>	U <sub>5</sub>	
Akar	6	4	2	6	1	19
Batang	-	13	-	-	3	16
Daun	6	3	-	-	-	9

Keterangan: U (Ulangan)

**Tabel 2.** Karakterisasi isolat bakteri endofit secara morfologi

Kode isolat	Pengamatan morfologi			
	Elevasi	Penampakan	Tepi	Warna
AKE1	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	Krem
AKE2	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	Kuning
AKE3	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Krem
AKE4	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Putih
AKE5	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Putih
AKE6	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Putih
AKE7	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Putih
AKE8	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Putih
AKE9	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Undulate</i>	Kuning
AKE10	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	Putih
AKE11	<i>Raised</i>	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	Putih
AKE12	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	<i>Entire</i>	Putih
AKE13	<i>Raised</i>	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	Kuning
AKE14	<i>Convex</i>	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	Kuning
AKE15	<i>Convex</i>	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	Kuning
AKE16	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	Putih
AKE17	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	Putih
AKE18	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	Kuning

Total 44 isolat endofit dari tumbuhan akar kuning asal Pulau Enggano, kemudian diseleksi dan dimurnikan berdasarkan perbedaan karakter morfologi koloni sehingga didapatkan 18 isolat bakteri endofit. Koloni murni yang diperoleh diberi kode sebagai AKE1 sampai AKE18. Delapan belas isolat endofit kemudian dilakukan karakterisasi secara morfologi dengan parameter tepi, penampakan, elevasi serta warna koloni (Tabel 2).

### Pengujian Bakteri Endofit dalam Melarutkan Fosfat secara Kualitatif

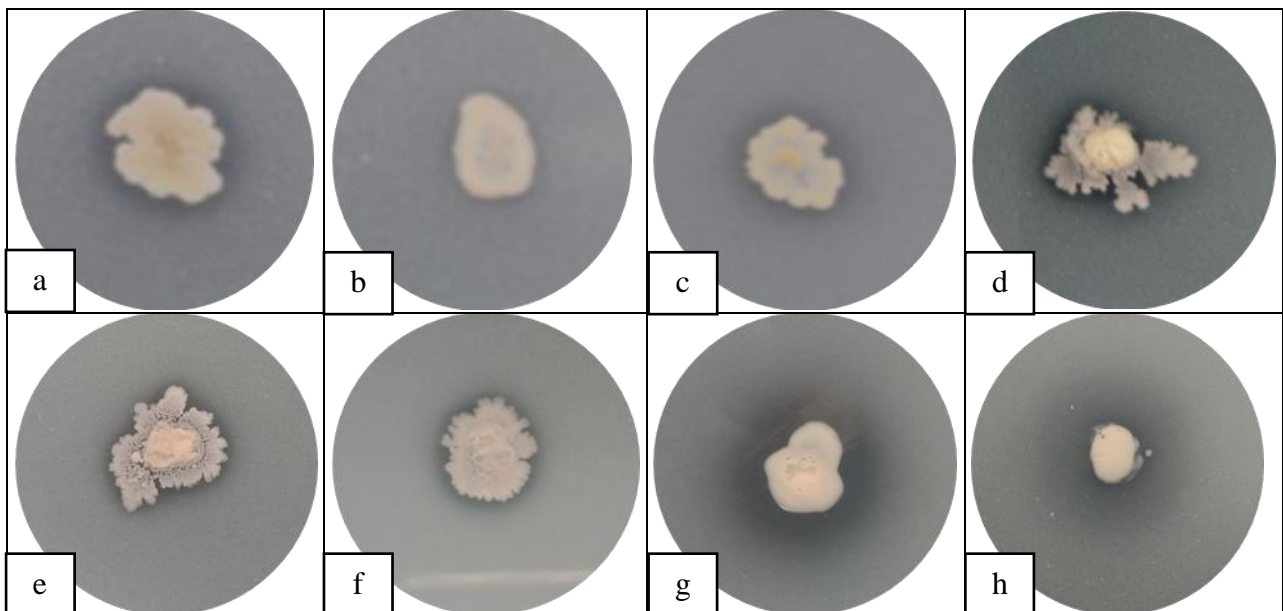
Pengujian kemampuan isolat endofit dalam melarutkan fosfat secara kualitatif dilakukan dengan metode totol langsung pada media agar-agar Pikovskaya dan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri dilakukan penghitungan Indeks Pelarutan Fosfatnya (IP) (Tabel 3).

Berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media Pikovskaya, dari 18 isolat bakteri endofit, 8 di antaranya mampu melarutkan fosfat. Isolat AKE15 menghasilkan indeks pelarut fosfat tertinggi yaitu senilai 1,59 dan isolat AKE7 dengan indeks pelarut fosfat yang rendah, yaitu senilai 0,06.

**Tabel 3.** Indeks pelarutan fosfat (IP) dari 18 bakteri endofit yang diisolasi dari akar kuning

Kode isolat	Pelarut fosfat		
	1	2	3
AKE1	-	-	-
AKE2	-	-	0,11
AKE3	0,21	0,25	0,28
AKE4	-	-	-
AKE5	0,9	0,1	0,14
AKE6	-	-	-
AKE7	-	-	0,06
AKE8	-	-	-
AKE9	-	-	-
AKE10	-	-	-
AKE11	0,29	0,45	0,51
AKE12	0,16	0,21	0,29
AKE13	-	-	-
AKE14	-	-	-
AKE15	0,73	1,39	1,59
AKE16	-	-	-
AKE17	-	-	-
AKE18	0,35	0,65	1,01

Keterangan: AKE= Tumbuhan akar kuning Enggano; Nomor isolat= 1–18; 1,2,3= waktu isolasi bakteri selama 24 jam



**Gambar 1.** Delapan isolat bakteri endofit yang dapat melarutkan fosfat setelah diinkubasi selama 72 jam yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media Pikovskaya, yaitu AKE2 (a), AKE3 (b), AKE5 (c), AKE7 (d), AKE11 (e), AKE12 (f), AKE15 (g), dan AKE18 (h)

Kemampuan 8 isolat endofit pelarut fosfat yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media Pikovskaya. Hal ini menunjukkan adanya potensi bakteri endofit akar kuning dalam melarutkan fosfat pada media tersebut melalui

mekanisme sekresi asam organik ataupun enzim fosfatase dan fitase yang dapat dilihat pada Gambar 1.

### Identifikasi Isolat Bakteri Pelarut Fosfat

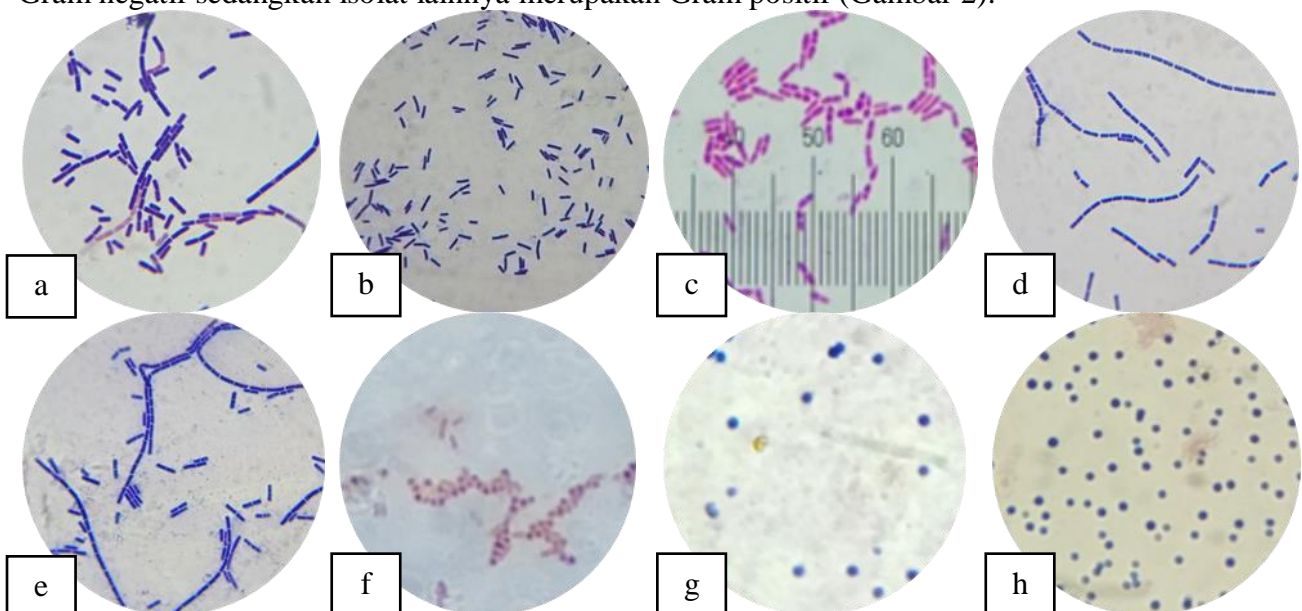
Isolat yang mampu melarutkan fosfat kemudian diuji secara fisiologis dan biokimia serta pewarnaan Gram untuk melihat kedekatan genus dari 8 isolat bakteri endofit pelarut fosfat. Adapun pengujian biokimia yang dilakukan yaitu uji katalase, uji sitrat, uji motilitas, uji urease, serta uji gula-gula yang meliputi gula glukosa, maltosa, laktosa, serta sukrosa (Tabel 4)

**Tabel 4.** Hasil uji biokimia 8 isolat bakteri pelarut fosfat potensial

Kode sampel	Pewarnaan Gram	Bentuk dan penataan	Uji biokimia							
			K	Si	Mo	U	Uji gula-gula			
							G	M	L	S
AKE2	Positif	<i>Streptobacil</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
AKE3	Positif	<i>Streptobacil</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
AKE5	Negatif	<i>Streptobacil</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
AKE7	Positif	<i>Streptobacil</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
AKE11	Positif	<i>Streptobacil</i>	+	+	+	-	+	-	+	+
AKE12	Negatif	<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	-	+	-	+	+
AKE15	Positif	<i>Monococcus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
AKE18	Positif	<i>Monococcus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+

Keterangan: K= Katalase; Si= Sitrat; Mo= Motilitas; U= Urea; G= Glukosa; M= Maltosa; L= Laktosa; S= Sukrosa

Pewarnaan Gram juga dilakukan untuk melihat isolat yang diperoleh termasuk dalam kelompok Gram positif atau negatif. Dari 8 isolat endofit 2 isolat di antaranya merupakan bakteri Gram negatif sedangkan isolat lainnya merupakan Gram positif (Gambar 2).



**Gambar 2.** Pewarnaan Gram dari 8 isolat bakteri endofit pelarut fosfat dengan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop binokuler yaitu AKE2 (a), AKE3 (b), AKE5 (c), AKE7 (d), AKE11 (e), AKE12 (f), AKE15 (g), AKE18 (h)

### PEMBAHASAN

Pemanfaatan bakteri endofit telah banyak digunakan sebagai pengendali hayati. Keberadaan bakteri endofit yang terdapat pada jaringan vaskuler tumbuhan memiliki hubungan simbiosis mutualisme yang menguntungkan bagi tumbuhan dan tidak menimbulkan efek negatif pada

tumbuhan inangnya (Mano & Morisaki, 2008). Adanya bakteri endofit pada jaringan tumbuhan juga memicu pertumbuhan dan memiliki peran sebagai agen pengendali hayati. Sehingga senyawa yang dihasilkan bakteri endofit dari tumbuhan akar kuning dapat dikembangkan dan berpotensi di dalam bidang medis, pertanian, dan industri (Ryan et al., 2008).

Total isolat yang berhasil diisolasi dari tumbuhan akar kuning sebanyak 44 isolat dengan 19 isolat dari organ akar, 16 isolat dari batang, dan 9 isolat dari bagian daun. Menurut Lamb et al. (1996) yang menyatakan bahwa umumnya bakteri endofit banyak terdapat di akar dan semakin menurun jumlahnya pada batang dan daun. Hal ini dapat disebabkan karena akar yang berada di dalam tanah sehingga dapat dipengaruhi oleh bakteri tanah dan kebanyakan bakteri endofit masuk melalui jaringan tanah sehingga jumlah pada bagian akar lebih banyak di akar (Desriani et al., 2013).

Berdasarkan Tabel 2, terdapat 18 isolat bakteri yang dimurnikan dan diseleksi berdasarkan bentuk morfologi koloni yang berbeda. Elevasi koloni isolat bakteri endofit dominan *flat* (datar) dan selebihnya *raised* dan *convex*. Penampakan isolat bakteri endofit lebih dominan *filamentous* seperti bentuk benang. Warna putih dominan dan hampir dimiliki oleh seluruh isolat bakteri dan warna kuning di beberapa isolat bakteri endofit. Karakteristik morfologi isolat bakteri endofit dari biakan murni selanjutnya dilakukan proses identifikasi dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia (Lay, 1994).

Pengujian kemampuan bakteri endofit dalam melarutkan fosfat secara kualitatif dilakukan dengan menotolkan isolat bakteri langsung ke atas media Pikovskaya, hasil uji positif berupa terbentuk zona bening di sekitar koloni kemudian dilakukan penghitungan indeks pelarutan fosfatnya (IP). Berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media Pikovskaya, dari 18 isolat endofit 8 isolat di antaranya memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat. Terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menghasilkan asam organik ekstraseluler yang mampu berikatan dengan ion  $\text{Ca}^+$  yang terikat dalam bentuk  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  pada media Pikovskaya agar dan membebaskan ion  $\text{H}^+$  yang terikat dalam bentuk  $\text{H}_2\text{PO}_4$  sehingga membentuk area yang bewarna lebih jernih daripada area yang masih memiliki fosfat terikat (Purwaningsih, 2012). Menurut Widawati dan Suliasih (2006) asam organik tersebut dapat berupa asam sitrat dan malat.

Hasil pengukuran Indeks Pelarutan Fosfat (IP) dari 8 isolat menunjukkan hasil IPF yang berbeda-beda, hal ini disebabkan karena kemampuan bakteri endofit yang berbeda-beda dalam menghasilkan asam organik, enzim fosfatase, dan fitase (Adu-Tae, 2004). Indeks pelarutan fosfat tertinggi dihasilkan oleh isolat AKE15 yaitu sebesar 1,59 dan indeks pelarutan fosfat terendah pada isolat AKE7 (0,06) (Tabel 3). Berdasarkan kemampuan pelarutan fosfat secara kualitatif yang paling tinggi, terpilih 2 isolat endofit potensial, yaitu isolat AKE15 dan AKE18.

Pengamatan dari pewarnaan Gram secara mikroskopis juga dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri endofit yang mampu melarutkan fosfat. Hasil pengamatan dari pewarnaan Gram pada 8 isolat bakteri endofit menghasilkan 6 isolat endofit (AKE2, AKE3, AKE7, AKE11, AKE15, AKE18) yang termasuk ke dalam bakteri Gram positif dan 2 isolat lainnya (AKE5 dan AKE12) merupakan bakteri Gram negatif (Gambar 2).

Bakteri Gram positif akan berwarna ungu saat diwarnai karena menyerap zat warna kristal violet yang tetap bertahan meskipun diberi larutan pemucat. Hal ini karena struktur dinding sel bakteri Gram positif yang terdiri dari peptidoglikan lebih tebal, sehingga ketika diberi larutan kristal violet, zat ini tetap terikat pada dinding sel, dan dinding sel tidak lagi menyerap safranin. Berbeda dengan pewarnaan Gram isolat AKE5 menunjukkan hasil Gram negatif karena struktur dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan peptidoglikan yang rendah dan kandungan lipid yang tinggi pada bagian membrannya sehingga lipid akan mudah larut saat diberi larutan pemucat (alkohol), sehingga pori-pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut kompleks kristal violet dan menyerap pewarna safranin yang menyebabkan bakteri berwarna merah (Sastrahidayat, 2011).

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi, pewarnaan Gram, dan uji biokimia pada tabel 4 yang menunjukkan 8 isolat endofit memiliki kedekatan dengan genus *Bacillus*, *Micrococcus*,

*Pseudomonas*, dan *Morococcus* (Holt et al., 1994) Isolat AKE2, AKE3, AKE7, dan AKE 11 memiliki morfologi dengan elevasi yang rata dan penampakan seperti benang serta warna putih kekuningan. Uji biokimia yang telah dilakukan menunjukkan sifat fisiologis isolat bakteri. Hasil uji katalase menunjukkan bakteri dapat menghasilkan enzim katalase, menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama, dan bersifat motil. Pewarnaan Gram menunjukkan isolat-isolat ini termasuk ke dalam kelompok Gram positif dengan bentuk batang (*bacil*) dengan penataan sel streptobasil. Keempat isolat tersebut memiliki kemiripan dengan genus *Bacillus* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9. Hal ini juga didukung oleh pernyataan Barrow dan Feltham (1993) yang menyatakan bahwa genus *Bacillus* merupakan bakteri berbentuk batang, tergolong bakteri Gram positif, dan motil. Harni et al. (2007) melaporkan bakteri genus *Bacillus* memiliki kemampuan sebagai agen hayati pada tumbuhan dan pemacu pertumbuhan pada tanaman.

Isolat AKE15 dan AKE18 memiliki morfologi koloni yang tidak beraturan dan berbentuk benang dengan isolat berwarna kuning. Uji biokimia menunjukkan bahwa isolat AKE15 dan AKE18 memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase dan mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, bersifat motil namun tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan menghasilkan enzim urease. Isolat ini termasuk ke dalam bakteri Gram positif dengan bentuk bulat (*coccus*). Kedua isolat ini memiliki kemiripan dengan genus *Micrococcus* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9. Hal ini juga didukung oleh pernyataan Alexander (1977) yang menyatakan bahwa *Micrococcus* dapat menguraikan jenis-jenis kompleks hidoksida Ca-, Fe-, Al-, Mn-, dan Mg- yang berikatan dengan fosfat. Berdasarkan Buchanan dan Gibbons (1974) serta Holt et al. (1994) yang menyatakan bahwa Genus *Micrococcus* memiliki ciri sel berbentuk bulat, berukuran 0,5–2,0 µm. Sel tersusun tunggal, tetrad, bergerombol, sifat Gram positif, dan jarang motil. Dastager et al. (2010) menyatakan bahwa bakteri genus *Micrococcus* mempunyai kemampuan sebagai pemacu pertumbuhan pada tanaman, yakni memproduksi auksin, 1-aminosiklopropana-1-karboksilat deaminase, dan siderofor.

Isolat AKE5 yang memiliki morfologi penampakan yang seperti benang serta koloni dengan warna putih. Uji biokimia menunjukkan isolat AKE5 dapat menghasilkan enzim katalase, mengubah sitrat menjadi sumber karbon, bersifat motil serta mampu menggunakan glukosa, sukrosa, laktosa, dan maltosa sebagai sumber karbon. Pewarnaan Gram dari isolat AKE5 menunjukkan bahwa isolat ini masuk kedalam kelompok bakteri Gram negatif dengan bentuk batang (*bacil*) dengan penataan sel berupa streptobasil. Isolat AKE5 menunjukkan kemiripan dengan genus *Pseudomonas* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9. Pada penelitian Dwipayana dan Herto (2009) yang menyatakan ciri-ciri genus *Pseudomonas* yaitu motil dan Gram negatif. Palleroni (1984) juga mengemukakan bahwa karakteristik genus *Pseudomonas* yaitu berbentuk batang, Gram negatif, dan bergerak dengan satu flagela atau lebih. Genus *Pseudomonas* memiliki peran dalam memproduksi IAA (auksin), ACC deaminase, pelarut logam berat, siderofor, dan antifungi (Zaidi et al., 2009).

Isolat AKE12 memiliki morfologi koloni tidak beraturan, elevasi yang rata, serta warna koloni yang menunjukkan warna putih. Pengujian biokimia menunjukkan isolat AKE12 mampu mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen serta menghasilkan enzim katalase, mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama. Namun, tidak dapat menghasilkan enzim urease. Tergolong bakteri Gram negatif dengan bentuk bulat (*coccus*) serta penataan seperti anggur (*staphylococcus*). Bakteri AKE12 memiliki kemiripan dengan genus *Morococcus* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9 yang memiliki bentuk bulat dan bergerombol seperti anggur, tumbuh pada suhu 23–42 °C serta dapat menghasilkan enzim katalase (Holt et al., 1994). Isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas melarutkan fosfat, setelah diuji pewarnaan Gram dan uji biokimia teridentifikasi ke dalam 4 genus yang berbeda. Genus *Morococcus* memiliki peran dalam memproduksi karbonat anhidrase untuk mengasosiasikan mineralisasi (Baris et al., 2017).

Berdasarkan delapan isolat yang teridentifikasi mirip dengan genus *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, dan *Morococcus* memiliki peranan dalam *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB), yaitu sebagai agen hayati dan pemacu pertumbuhan tanaman, yakni dalam memproduksi



auksin, ACC deaminase, siderofor, pelarut logam berat, antifungi, dan karbonat anhidrase yang dapat menimbulkan dampak positif terhadap pertumbuhan tanaman berupa pembesaran dan perpanjangan sel, mengendalikan hormon etilen pada kondisi tingkat salinitas yang tinggi, pengkhat besi untuk pertumbuhan tanaman, mineralisasi tanaman, menghambat mikroba patogen, dan mengurangi tingkat pencemaran logam berat di sekitar tanaman.

## SIMPULAN DAN SARAN

Sebanyak 44 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari tumbuhan akar kuning dan 18 isolat diseleksi dan dimurnikan pada media NA berdasarkan morfologi koloni yang berbeda. Delapan isolat endofit di antaranya memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat pada media Pikovskaya. Dua isolat endofit dengan indeks pelarut fosfat tertinggi yaitu isolat AKE15 dan AKE18 menghasilkan IPF sebesar 1,59 dan 1,01. Setelah dilakukan pewarnaan Gram dan uji biokimia, 8 isolat yang diperoleh menunjukkan kedekatan dengan genus *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, dan *Morococcus*. Isolat-isolat ini bisa menjadi kandidat bakteri yang berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman dimasa depan khususnya dalam membantu ketersediaan fosfat di tanah.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlunya dilakukan identifikasi secara molekuler untuk mengetahui spesies dari bakteri endofit yang dapat melarutkan fosfat serta karakterisasi jenis senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Bengkulu melalui Hibah Unggulan Tahun 2019 dengan nomor kontrak 4444/UN30.15/PG/2019 tanggal 09 Juli 2019 atas nama Dr. Sipriyadi S.Si., M.Si, yang telah membantu memberikan pendanaan dalam proses pelaksanaan penelitian ini hingga dapat terselesaikan hingga akhir, serta kepada masyarakat Pulau Enggano dan pada berbagai pihak yang terlibat dalam penelitian ini.

## REFERENSI

- Adu-Tae, A. S. J. (2004). Efisiensi pemupukan fosfat dan hasil kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) varietas lokal Kupang Barat akibat pemberian pupuk fosfat, kotoran sapi, dan bakteri pelarut fosfat (Disertasi doctoral). Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung, Bandung, Jawa Barat, Indonesia.
- Alexander, M. (1977). *Introduction to soil microbiology 2<sup>nd</sup> edition*. New York: John Wiley and Sons.
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2006). *Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. Plant Associated Bacteria*. Netherland: Springer.
- Baris, O., Demir, T., & Gulluce, M. (2017). Investigation of in vitro mineral forming bacterial isolates from supragingival calculus. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 20(12), 1571-1575.
- Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Journal Soil Ecology*, 34, 33-41.
- Dastager, S., Deepa, C. K., & Pandey, A. (2010). Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 987-992.
- Desriani., Kusumawati, D. E., Rivai, A., Hasanah, N., Amrinola, W., Triratnal, L., & Sukma, A. (2013). Potential endophytic bacteria for increasing paddy var rojolele productivity. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 3(1), 76-78.

- Desriani., Safira, U. M., Bintang, M., Rivai, A., & Lisdiyanti, P. (2014). Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit dari tanaman binahong dan katepeng China. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3(2), 89-93.
- Dwipayana., & Herto. (2009). *Identification of bacterial diversity in waste recycling paint sludge by conventional microbiological technique*. Bandung: LAPI ITB.
- Fadhilah, N. F., Hasanah, U., & Idramsa. (2015). Karakterisasi bakteri endofit pelarut fosfat dari kulit batang tumbuhan raru (*Cotylelobium melanoxylon*). *Jurnal Biosains*, 1(1), 31-38. doi: 10.24114/jbio.v1i1.5219.
- Glickman, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 61(2), 793-796. doi: 10.1128/aem.61.2.793-796.1995.
- Harni, R., Munif, A., Supramana., & Mustika, I. (2007). Pemanfaatan bakteri endofit untuk mengendalikan Nematoda peluca akar (*Pratylenchus brachyurus*) pada tanaman nilam. *HAYATI Journal of Biosciences*, 14(1), 7-12. doi: 10.4308/hjb.14.1.7.
- Holt, J. G., Krig, N. R., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (1994). *Bergeys manual of determinative bacteriology 9<sup>th</sup> edition*. Philadelphia USA: Lipincott Williams and Wilkins Company.
- Jutono., Joedoro., Hartati, S., Kabirun, S., Suhadi., & Soesanto. (1978). *Pedoman praktikum mikrobiologi umum untuk perguruan tinggi*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. *Agronomy for Sustainable Development Journal*, 27(1), 29-43. doi: 10.1051/agro:2006011.
- Lamb, T. G., Tonkyn, D. W., & Kluepfel, D. A. (1996). Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 1112-1120.
- Lay. B. W. (1994). *Analisis mikroba di laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo.
- Mano, H., & Morisaki, H. (2008). Minireview: Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environments*, 23(2), 109-117. doi: 10.1264/jsme2.23.109.
- Maryanto, I., Hamidy, A., Keim, A. P., Sihotang, V. P. L., Lupiyaningdyah, P., Irham, M., & Ardiyani, M. (2015). *Ekspedisi Pulau Enggano*. Jakarta: LIPI Press.
- Matos, A. D. M., Gomes, I. C. P., Nietsche, S., Xavier, A. A., Gomes, W. S., Neto, J. A. D. S., & Pereira. M. C. T. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2945-2954.
- Palleroni, N. J. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Pelczar, E. M., & Chan, E. (2005). *Basic of microbiology*. New York: Mc-Graw Hill Lange.
- Premono, M. E., Moawad A. M., & Vlek, P. L. G. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesia. *Journal Crop Science*, 11, 13-23.
- Purwaningsih, S. (2012). Isolasi, populasi, dan karakterisasi bakteri pelarut fosfat pada daerah perakaran dan tanah dari Bengkulu, Sumatra. *Journal Teknik Lingkungan*, 13(1), 101-108. doi: 10.29122/jtl.v13i1.1410.
- Radu, S., & Kqueen, C. Y. (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 9(2), 23-33.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Minireview: Bacterial endophytes: Recent development and application. *FEMS Microbiol Letter*, 278(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x.
- Sastrahidayat, I. R. (2011). *Fitopatologi (ilmu penyakit tumbuhan)*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

- Wandita, R. H., Pujiyanto, S., Supriyadi, A., & Hastuti, R. D. (2018). Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit pelarut fosfat dan penghasil *hidrogen cyanide* (HCN) dari tanaman bawang merah (*Allium cepa* L). *Jurnal Bioma*, 20(1), 9-16. doi: 10.14710/bioma.20.1.9-16.
- Widawati, S., & Suliasih, S. (2006). The population of phosphate solubilizing bacteria (PSB) from Cikaniki, Botol Mountain, and Ciptarasa Area, and the ability of psb to solubilize insoluble p in solid pikovskaya medium. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 7, 109-113.
- Yulianti, T. (2012). Menggali potensi endofit untuk meningkatkan kesehatan tanaman tebu mendukung peningkatan produksi gula. *Perspektif*, 11(2), 113-123.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284. doi: 10.1556/AMicr.56.2009.3.6.