

## SELEKSI DAN IDENTIFIKASI ENDOFIT PEMACU PERTUMBUHAN DARI LIMA VARIETAS TEBU DI PT GUNUNG MADU PLANTATIONS LAMPUNG

### Screening and Identification of Plant Growth Promotion Endophyte from Five Sugarcane Varieties in PT Gunung Madu Plantations Lampung

Remaja Sitepu<sup>1)\*</sup>, Suryo Wiyono<sup>2)</sup> dan Dwi Andreas Santosa<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Bioteknologi Tanah dan Lingkungan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

<sup>2)</sup> Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

<sup>3)</sup> Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

#### ABSTRACT

Endophyte is the bacteria or fungi which are associate and colonize of internal plant tissues naturally without negatively impacting of their host. A number of endophytes are useful to plants because play a role as plant growth promotion or as biological control agent. The purpose of this study were to select and identify of plant growth promotion endophytes from five sugarcane varieties in PT Gunung Madu Plantations Lampung. A total of 82 isolates that had passed from hypersensitive reaction and hemolysis test were screened in two stages. The first stage was performed in laboratory by inoculating of the endophytes on the rice seed and evaluating of the sprouts performance after seven days. Isolates that passed in the first stage were continued to the second by inoculating them to the sugarcane seed in semi-field test. Growth of the sugarcane plant test was evaluated up to six weeks after planting. A total of 9 bacteria and 9 fungi isolates were indicated as plant growth promotion in the first stage, but only two bacterial and one fungal isolates were consistent in the second stage. Molecular identification and alignment of the sequences on the BLAST showed that N12 (isolated from GMP3 root) was 100% identical with *Bacillus safensis*, L16 (isolated from GMP3 leaf) was 99% identical with *Domibacillus robiginosus*, and C78 (isolated from PS48 stem) was 99% identical with *Cladosporium cladosporioides*. The three isolates were able to produce of auxin, cytokines, and gibberellins, but *B. safensis* is higher than the other two.

Keywords: *Bacillus safensis*, Bacteria, hypersensitive reaction test

#### ABSTRAK

Endofit adalah bakteri atau cendawan yang secara alami berasosiasi dan mengkolonisasi jaringan internal tumbuhan tanpa menimbulkan dampak negatif pada inangnya. Sejumlah endofit bermanfaat bagi tanaman karena berperan sebagai pemacu pertumbuhan ataupun sebagai pengendali hayati. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyeleksi dan mengidentifikasi endofit yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan dari lima varietas tebu PT Gunung Madu Plantations Lampung. Sebanyak 82 isolat yang telah lolos dalam uji reaksi hipersensitif dan hemolisis diskriming dalam dua tahap. Tahap pertama dilakukan di laboratorium dengan menginokulasikan endofit pada benih padi dan mengevaluasi kecambahnya setelah umur tujuh hari. Isolat yang lolos pada tahap pertama dilanjutkan ke tahap kedua dengan menginokulasikannya pada bibit tebu dalam skala semi lapangan. Pertumbuhannya tanaman tebu dievaluasi hingga 6 minggu setelah tanam. Sebanyak 9 isolat bakteri dan 9 isolat cendawan terindikasi sebagai pemacu pertumbuhan pada tahap pertama, tetapi hanya dua isolat bakteri dan satu isolat cendawan yang konsisten pada pengujian tahap kedua. Identifikasi molekuler ketiga isolat tersebut dan pencocokan sekuens pada BLAST menunjukkan bahwa isolat N12 yang terisolasi dari akar GMP3 mirip dengan *Bacillus safensis* 100%, L16 yang terisolasi dari daun GMP3 mirip dengan *Domibacillus robiginosus* 99%, dan C78 yang terisolasi dari batang PS48 mirip dengan *Cladosporium cladosporioides* 99%. Ketiga isolat tersebut mampu menghasilkan auksin, sitokinin, and gibberelin dengan kecenderungan *B. safensis* lebih tinggi dibanding dua lainnya.

Kata kunci: *Bacillus safensis*, bakteri, uji reaksi hipersensitif

#### PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) adalah tanaman penting penghasil gula yang ditanam di lebih dari 80 negara berlintang di bawah 35° LU/LS di seluruh dunia. Tebu menyimpan sukrosa pada batangnya dan diekstrak di pabrik untuk menghasilkan kristal gula. Sekitar 75% gula

dunia berasal dari tebu, sisanya diperoleh dari bit gula, aren, kelapa, dan juga kurma (Ming *et al.*, 2006).

Pertambahan penduduk dunia, keterbatasan lahan, peningkatan biaya operasional, serta dampak negatif dari sistem budidaya konvensional telah mendorong sistem budidaya tebu ke arah yang lebih produktif, efisien, berkesinambungan, serta bersahabat dengan lingkungan. Salah satu upaya yang bisa dilakukan adalah dengan

memanfaatkan endofit, yaitu bakteri atau cendawan yang secara alami berasosiasi dan mengkolonisasi jaringan internal tanaman tanpa menimbulkan dampak negatif pada inangnya (Hudson *et al.*, 2010).

Sejumlah endofit diketahui bermanfaat bagi tanaman karena mampu berperan sebagai pemacu pertumbuhan (*plant growth promotion*) dan juga sebagai pengendali hayati (*biological control agent*). Bakteri endofit tebu, seperti *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., dan *Pantoea* sp. diketahui mampu memfiksasi N<sub>2</sub> dari udara sehingga berpotensi mengurangi atau menggantikan penggunaan pupuk sintetik (Bertalan *et al.*, 2009; Loiret *et al.*, 2004; Njoloma *et al.*, 2006). Bakteri *Burkholderia* spp. dan cendawan *Epicoccum nigrum* juga dilaporkan memiliki potensi sebagai agen pengendali hayati pada tebu karena mampu menghasilkan beberapa komponen antimikroba, seperti: *pyrrolnitrin* (Mendes *et al.*, 2007), *epicorazines*, *epirodines*, *flavipin*, *epicoccines*, *epipiridones*, dan *epicocarines* (Favaro *et al.*, 2012).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyekring endofit yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan dari lima varietas tebu di PT Gunung Madu Plantations (GMP) Lampung Tengah. Hallmann *et al.* (1997) menyebutkan bahwa struktur komunitas endofit pada tanaman sangat tergantung pada faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik, seperti: genotipe, taksonomi, dan perlakuan spesifik (pupuk dan pestisida) sangat memengaruhi komposisi komunitas endofit di dalam tanaman (Balint *et al.*, 2013). Oleh karena itu, variasi endofit yang terisolasi dari lima varietas tersebut mungkin akan berbeda-beda. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat menambah pengetahuan tentang endofit tebu dan menjadi referensi dalam melakukan penelitian-penelitian selanjutnya.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2016 hingga Februari 2017 di GMP, sebuah perkebunan tebu swasta yang berlokasi di Kabupaten Lampung Tengah, 105°8' – 105°41' Bujur Timur dan 4°32' – 4°45' Lintang Selatan dengan ketinggian 30-40 m di atas permukaan laut. Endofit yang diseleksi terdiri dari 47 isolat bakteri dan 35 isolat cendawan yang diperoleh dari akar, batang, dan daun tebu varietas GMP3, GMP7, GM24, PS48, dan TC15. Seleksi dilakukan dengan dua tahap, yaitu tahap I untuk mendapatkan paling banyak 20 endofit terbaik dan tahap 2 untuk mendapatkan paling banyak 5 endofit yang paling potensial sebagai pemacu pertumbuhan tebu. Tahap I dilakukan di laboratorium dengan padi sebagai tanaman uji, sedangkan tahap II dilakukan pada kondisi semi-lapangan dengan tebu sebagai tanaman uji.

### Seleksi Tahap I pada Tanaman Padi

Pengujian dilakukan mengacu pada Hidayati (2014) dengan menginokulasikan endofit pada benih padi dan mengevaluasi pertumbuhannya setelah berumur satu minggu. Inokulum bakteri dibuat dengan cara menumbuhkan isolat pada media molases 0.3% dan di-*shaker* selama 5 hari. Konsentrasi yang dicapai dengan cara tersebut adalah sekitar  $2.9-13.1 \times 10^{10}$  CFU ml<sup>-1</sup>. Benih padi diinokulasi dengan merendamnya dalam

suspensi inokulum selama 24 jam. Setelah itu, disemai secara aseptik di atas kertas saring lembap sebanyak 25 biji per cawan petri dan diinkubasikan pada ruangan bersuhu 28 °C selama 7 hari. Setiap isolat diulang 3 kali. Sebagai kontrol negatif, benih padi direndam dalam media molases 0.3% steril yang sudah diinkubasikan di atas *shaker* selama 5 hari.

Untuk cendawan, inokulum murni dibuat dengan menumbuhkan isolat pada PDA dalam cawan petri selama tujuh hari. Setelah itu, benih padi yang sudah direndam dalam air steril selama 24 jam disemai di atas koloni cendawan sebanyak 25 biji per cawan petri dan diulang 3 kali. Sebagai kontrol negatif, benih padi disemai pada permukaan media PDA umur tujuh hari tanpa keberadaan cendawan. Selanjutnya, benih yang sudah disemai diinkubasikan sebagaimana halnya bakteri.

Setelah tujuh hari, perkecambahan padi dihitung dan dipisahkan bagian akar dan trubus (*upper part*) untuk ditimbang. Untuk mendapatkan berat kering, akar dan trubus dioven pada suhu 110 °C selama 12 jam sebelum ditimbang. Data yang diperoleh digunakan untuk menyeleksi paling banyak 10 endofit unggulan dengan syarat semua parameter pertumbuhan harus lebih baik dibanding kontrol. Jika jumlah isolat yang terpilih kurang dari 10 maka semua isolat diloloskan untuk seleksi tahap II, sedangkan bila lebih maka dibuat syarat tambahan yang ditentukan kemudian sesuai dengan kecenderungan data.

### Seleksi Tahap II pada Bibit Tebu

Inokulum bakteri dibuat dengan cara menumbuhkan isolat dalam molases 0.3% selama 7 hari pada mesin pengocok (*shaker*). Inokulasi bibit tebu (varietas GMP4) dilakukan dengan merendam bibit satu-mata dalam suspensi bakteri selama 2 jam. Setelah itu, bibit ditanam pada pot yang telah diisi media *top soil* dan pasir yang telah dipasteurisasi dengan perbandingan volume 3 : 1. Setiap pot ditanami 3 bibit tebu dan setiap isolat diulang pada 3 pot. Sebagai kontrol negatif, bibit tebu direndam dalam molases steril 0.3% yang juga telah diinkubasikan di atas *shaker* selama 7 hari. Untuk kontrol positif, tebu ditanam pada pot yang diaplikasi pupuk dasar (*basal fertilizer*) dengan dosis standar (STD) dan juga setengah dari standard (½ STD). Dosis pupuk standar adalah urea 150 kg ha<sup>-1</sup>, TSP 200 kg ha<sup>-1</sup>, dan KCl 150 kg ha<sup>-1</sup> (GMP, 2012), yang setara dengan urea 0.94 gram, TSP1.25 gram, dan KCl 0.94 gram per pot.

Inokulum cendawan dibuat dengan menumbuhkan isolat pada media beras lembap steril selama 10 hari. Sebanyak 40 gram beras yang sudah terkoloni disuspensikan dalam 700 ml air steril, ditambahkan perata poli-oksietilen sorbitan mono-oleat (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>) 0.1%, dan dihomogenkan dengan *stirer*. Suspensi tersebut digunakan untuk merendam bibit tebu selama 2 jam. Setelah itu, tebu ditanam pada pot sebagaimana halnya perlakuan bakteri. Sebagai kontrol negatif, bibit tebu direndam dalam air steril selama 2 jam, sedangkan kontrol positif menggunakan STD dan ½ STD.

Pengamatan jumlah tunas (*tillers*) dan juga tinggi tebu dilakukan pada 1-6 minggu setelah tanam (MST) dengan interval 1 minggu. Setelah 6 MST, tebu dibongkar, dibersihkan dari tanah, bagian akar dan trubus dimasukkan dalam amplop untuk dioven. Proses oven dilakukan pada

suhu 110 °C selama 48 jam dan setelah itu ditimbang. Data yang diperoleh digunakan untuk memilih endofit yang paling berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tebu. Endofit yang menjadi target adalah endofit yang tebusnya mampu menyamai kontrol positif atau paling kurang lebih baik dari kontrol negatif.

Data yang diperoleh diolah dengan menganalisa keragamannya dan bila ditemukan perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil pada taraf uji 95%.

### Identifikasi Spesies Pemacu Pertumbuhan Terbaik

Identifikasi spesies dilakukan dengan sekuensing gen 16S rRNA untuk bakteri dan ITS untuk cendawan. Untuk keperluan tersebut, sampel dikirim ke *Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology (ICBB)* Bogor. Selain sekuensing, kemampuan endofit dalam menghasilkan hormon pertumbuhan: auksin, sitokinin, dan gibberelin juga diuji dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Seleksi Tahap I pada Tanaman Padi

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata perkecambahan padi dari 47 isolat bakteri adalah 72.8%. Angka ini lebih rendah 2.4% dibanding kontrolnya. Rata-rata berat basah kecambah adalah 0.402 g per cawan sedangkan berat keringnya 0.0667 g cawan. Berat basah dan berat kering per cawan lebih tinggi dari kontrol, masing-masing 0.045 dan 0.0049 gram. Untuk cendawan, rata-rata perkecambahan padi dari 35 isolat adalah 18.8%, lebih tinggi 2.5% dibanding kontrol. Rata-rata berat basahnya adalah 0.021 g per cawan sedangkan berat keringnya 0.006 g per cawan. Angka tersebut lebih rendah masing-masing 0.001 dan 0.0002 gram dibanding kontrolnya. Perkecambahan, berat basah, maupun berat kering yang lebih rendah dari kontrol diduga terjadi karena ada di antara endofit yang memiliki efek negatif terhadap pertumbuhan padi.

Endofit yang perkecambahan, berat basah, atau berat kering padinya lebih rendah dari kontrol diskrening.

Hasilnya terpilih 9 isolat cendawan dan 23 isolat bakteri. Untuk cendawan, karena jumlahnya hanya 9 isolat maka semuanya langsung terpilih untuk pengujian berikutnya. Untuk bakteri, dibuat ketentuan tambahan yaitu perkecambahan padinya paling sedikit 80% sehingga hanya terpilih 9 isolat (data tidak ditampilkan).

Kandidat pemacu pertumbuhan dari golongan bakteri memiliki parameter kecambah padi yang lebih baik dibanding cendawan. Walaupun begitu, hal tersebut tidak bisa langsung dibandingkan karena media pertumbuhan yang digunakan memang berbeda. Kandidat endofit pemacu pertumbuhan paling banyak diperoleh dari varietas GMP3, yaitu 11 isolat. GMP3 adalah varietas hasil persilangan dan seleksi mandiri PT GMP dan dirilis secara nasional pada tahun 2012. Rata-rata produksi GMP3 adalah 115.13 ton tebu ha<sup>-1</sup>, rendemen 8.10%, dan hablur 9.34 ton ha<sup>-1</sup>. Selain unggul dalam hal potensi produksi, GMP3 juga memiliki daya adaptasi yang luas terhadap musim sehingga cocok ditanam di awal hingga akhir musim tanam (April - Oktober). GMP3 juga memiliki daya keprasan yang baik dan relatif tahan terhadap serangan hama dan penyakit utama (GMP, 2011).

### Seleksi Tahap II pada Bibit Tebu

Hasil pengamatan berat kering akar dan trubus tebu dari 18 isolat endofit dapat dilihat pada Tabel 1. Secara umum, berat kering akar berkorelasi positif dengan berat kering trubus. Hasil analisa regresi dan korelasi (Gomez dan Gomez, 1984) menunjukkan bahwa berat kering akar dan trubus membentuk kurva linier dengan korelasi sebesar 74.1% untuk bakteri dan 93.2% untuk cendawan.

Pada bakteri endofit, tidak ada isolat yang berat kering akar dan trubusnya lebih tinggi dari kontrol positif ½ STD maupun STD. Oleh karena itu, isolat yang dipilih hanya yang lebih baik dari kontrol negatif saja. Terdapat 4 isolat bakteri yang memenuhi kriteria tersebut, yaitu: N12, L16, N8, dan N3. Hal yang sama juga ditemukan pada perlakuan cendawan. Isolat yang mampu mengimbangi kontrol negatif hanya satu, yaitu C78. Berat kering trubus dari C78 lebih tinggi dari kontrol sementara berat kering akarnya tidak berbeda nyata.

Tabel 1. Berat kering akar dan trubus tebu umur 6 minggu dari 18 kandidat endofit pemacu pertumbuhan.

Bakteri	Berat kering (gram) <sup>1)</sup>		Cendawan	Berat kering (gram) <sup>1)</sup>	
	Akar	Trubus		Akar	Trubus
N12	5.94 bc	10.85 bc	P 22	5.04 cd	8.17 bc
L6	5.39 bc	9.67 c	C 77	1.76 ef	3.72 de
L5	4.48 cd	8.25 cd	C 61	2.63 ef	4.77 de
L16	6.05 bc	10.55 bc	C 49	2.70 ef	4.46 de
N5	5.25 bc	8.84 c	C 78	6.86 bc	10.85 b
N17	5.12 bc	8.61 cd	P 19	1.05 f	2.53 e
N8	6.99 ab	11.10 bc	C 64	3.44 de	6.27 cd
L12	5.36 bc	8.96 c	C 46	1.55 ef	2.90 e
N3	5.57 bc	9.72 c	C 54	6.33 bc	9.54 b
STD	6.86 ab	12.97 b	STD	8.91 a	16.69 a
½ STD	8.63 a	16.86 a	½ STD	7.21 ab	14.17 a
Kontrol	5.42 bc	8.74 cd	Kontrol	7.20 ab	10.02

<sup>1)</sup>pada kolom yang sama, perbedaan huruf yang menyertai angka-angka menunjukkan bahwa angka yang disertainya berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil dengan taraf uji 95%.

Tabel 2. Pengaruh endofit unggulan terhadap jumlah tunas dan tinggi tebu.

Jenis endofit	Perlakuan	Jumlah tunas (/pot) <sup>1)</sup>			Tinggi (cm) <sup>1)</sup>			
		4	5	6	3	4	5	6
		Minggu setelah tanam			Minggu setelah tanam			
Bakteri	N12	3.8bc	4.0bc	4.0b	9.9a	13.2 ab	15.3 abc	15.6 bc
	L16	3.8bc	4.3b	3.8bc	9.6a	12.6 ab	14.7bc	15.5 bc
	N8	3.0cd	4.0bc	3.8bc	8.0b	10.8c	13.3c	14.5c
	N3	2.0d	2.0c	2.0c	8.7ab	11.7bc	14.8bc	16.5 b
	STD	4.8ab	7.0a	7.3a	8.0b	11.7bc	15.7ab	17.5ab
	½ STD	5.8a	7.8a	7.3a	9.8a	13.7a	17.2a	19.3a
	Kontrol	2.3cd	2.3c	2.3bc	8.6ab	11.8 bc	15.0bc	16.8b
Cendawan	C78	4.25b	6.3b	5.8bc	8.7 <sup>m</sup>	12.0 <sup>m</sup>	14.6 <sup>m</sup>	16.1 <sup>m</sup>
	STD	8.50a	10.3a	10.3a	9.0	12.2	15.7	17.3
	½ STD	4.25b	5.5b	6.3b	8.3	11.5	14.9	16.3
	Kontrol	3.00b	3.3b	3.5c	8.9	11.7	13.8	15.5

<sup>1)</sup>Masing-masing untuk bakteri dan cendawan, perbedaan huruf yang menyertai angka-angka pada kolom yang sama menunjukkan bahwa angka tersebut berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil dengan taraf uji 95%.

Tabel 3. Kemampuan tiga endofit terpilih dalam menghasilkan hormon pertumbuhan tanaman (ICBB 2016).

Jenis hormon	Endofit		
	Bakteri N12 ( <i>B. safensis</i> )	Bakteri L16 ( <i>D. robiginosus</i> )	Cendawan C78 ( <i>C. cladosporioides</i> )
Auksin :	98.78 ppm	92.87 ppm	87.52 ppm
Sitokinin :			
<i>Zeatin</i>	56.13 ppm	52.71 ppm	50.82 ppm
<i>Kinetin</i>	62.24 ppm	60.34 ppm	65.14 ppm
Giberelin	118.23 ppm	106.44 ppm	100.88 ppm

Untuk mendukung data berat kering, data pertunas dari kelima isolat tersebut dianalisa. Hasilnya, tidak ditemukan perbedaan jumlah tunas yang nyata dari seluruh perlakuan dari umur 1-3 minggu setelah tanam (MST). Hal ini terjadi karena secara umum tebu memang belum membentuk tunas baru pada umur-umur tersebut. Matsuoka and Stolf (2012) menyebutkan bahwa pada kultivar tebu NA56-79, tunas sekunder terlihat pertama sekali setelah tunas primer berumur 26 hari. Tunas sekunder berikutnya muncul setelah tunas primer berumur 44-54 hari. Tunas tersier muncul setelah tunas primer berumur 76 - 79 hari.

Perbedaan jumlah tunas yang nyata baru terlihat setelah umur 4 - 6 MST (Tabel 2). Pada saat tersebut tidak ada endofit bakteri yang jumlah tunasnya lebih banyak dari kontrol positif. Walaupun begitu, 3 isolat (N12, L16, dan N8) yang diunggulkan berdasarkan berat kering akar dan trubus konsisten memiliki populasi yang lebih banyak dibanding kontrol negatif. Satu isolat, yaitu N3 memiliki jumlah tunas yang lebih sedikit dibanding kontrol negatif di umur 4-6 MST sehingga tidak terpilih sebagai isolat terbaik. Pada cendawan, isolat unggulan C78 memiliki jumlah tunas yang lebih banyak dibanding kontrol negatif di umur 4-6 MST, bahkan secara nyata mampu mengimbangi jumlah tunas yang dicapai oleh kontrol positif ½ STD.

Sedikit berbeda dengan pertunas, pengaruh nyata endofit terhadap tinggi tebu telah ditemukan sejak umur 3 hingga 6 MST. Pada umur tersebut, tebu tertinggi pada kelompok bakteri ditemukan pada perlakuan ½ STD tetapi tidak berbeda nyata dengan beberapa perlakuan lain di umur-umur tertentu. Tinggi tebu pada perlakuan ½ STD tidak berbeda nyata dengan N12 pada umur 3-5 MST, tetapi nyata lebih tinggi di umur 6 MST. Terhadap L16, ½ STD tidak memiliki perbedaan tinggi tebu yang nyata di umur 3 dan 4 MST tetapi nyata lebih tinggi di umur 5 dan 6 MST. Walaupun begitu, selisih tinggi sekitar 1-2 cm di

umur tersebut tidak banyak berpengaruh terhadap berat kering tanaman sehingga isolat N12 dan L16 tetap dipilih sebagai isolat terbaik. Terhadap N8, ½ STD nyata lebih tinggi sejak umur 3-6 MST. Tinggi tebu pada N8 bahkan lebih pendek dari kontrol negatif di umur-umur tersebut. Karena itu, isolat tersebut tidak lagi disertakan sebagai kandidat pemacu pertumbuhan. Isolat cendawan C78 memiliki tinggi tebu yang tidak berbeda nyata dengan ½ STD maupun STD. Secara angka, tinggi tebu pada perlakuan C78 lebih baik dibanding kontrol pada umur 4-6 MST sehingga isolat tersebut tetap terpilih sebagai salah satu isolat terbaik.

Berdasarkan data dan analisa ini, diperoleh 3 isolat terbaik untuk memacu pertumbuhan tebu, yaitu N12 dan L16 untuk golongan bakteri dan C78 untuk golongan cendawan. N12 adalah isolat bakteri yang diisolasi dengan media *Nutrient Agar* dari akar GMP3 dan tidak ditemukan pada varietas lain selain dari akar GMP3. Karakter koloni dari N12 berwarna krem, berukuran besar, karakter optik *translucent*, tekstur mengkilat, berbentuk sirkuler, elevasi *crateriform*, pinggiran *entire*, serta memiliki pertumbuhan yang cepat. Selnya berbentuk kokus dan berukuran kurang dari 1.0 µm.

L16 adalah bakteri yang diisolasi dengan media *Luria Bertani* dari daun GMP3. Isolat dengan ciri-ciri yang sama juga terisolasi dari batang TC15 dengan media isolasi PDA. Karakter koloni L16 berwarna merah muda tipis, kecil, *translucent*, mengkilat, berbentuk sirkuler, elevasi *raised*, pinggiran *entire*, serta pertumbuhannya lambat. Sel L16 berbentuk batang dan berukuran sekitar 3.2 × 1.0 µm.

C78 adalah cendawan yang terisolasi dari batang PS48 dengan media *Czapex Solution Agar* dan tidak ditemukan sumber lain selain varietas tersebut. Karakter koloni C78 berwarna abu-abu kehijauan, berukuran medium, tekstur halus, tipis dan ber-*halo*, berbentuk sirkuler, dan pertumbuhannya lambat. Memiliki miselia

bersekat dan bercabang dengan ukuran  $2.6 \times 45.8 \mu\text{m}$ , membentuk kolumella berukuran  $31.4 \mu\text{m}$ , serta memiliki spora sel tunggal berbentuk ellips dengan ukuran  $2.6 \times 5.2 \mu\text{m}$ .

### Identifikasi Species Pemacu Pertumbuhan Terbaik

Berdasarkan laporan ICBB (2016) diketahui bahwa gen 16S rRNA dari bakteri N12 terdiri dari 1399 bite. Pencocokan pada BLAST menunjukkan bahwa isolat N12 merupakan bakteri dari genus *Bacillus* dan paling mirip (100%) dengan *Bacillus safensis*. Menurut Lateef *et al.* (2015), *B. Safensis* bisa ditemukan di berbagai habitat, mampu bertahan di lingkungan yang ekstrim, serta memiliki rangkaian gen pemacu pertumbuhan. Bakteri ini mampu menghasilkan berbagai enzim dan metabolit sekunder, biasa digunakan dalam industri, dan dikenal sebagai *safe industrial microorganism* karena belum pernah dilaporkan sebagai patogen.

Sekuensing gen 16S rRNA dari bakteri L16 menunjukkan bahwa gen tersebut terdiri dari 1412 bite. Pencocokan pada BLAST menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk genus *Domibacillus* dan paling mirip (99%) dengan *Domibacillus robiginosus* strain ASGS4\_1. *D. robiginosus* dengan berbagai strain pernah terisolasi dari berbagai tempat, seperti: ruangan bersih (*pharmaceutical clean room*) perusahaan produsen vaksin, sedimen laut, air danau, dan juga dari udara. *Domibacillus* adalah bakteri dengan pigmen berwarna merah, Gram positif, sangat aerob, dan termasuk dalam famili Bacillaceae. Famili ini memiliki kemampuan membentuk endospora dalam batang sehingga tahan terhadap panas, radiasi, bahan kimia, dan kekeringan dalam waktu yang relatif lama. Bacillaceae memiliki peran alami yang penting, seperti keterlibatannya dalam siklus bahan organik dan juga menyehatkan atau merangsang pertumbuhan tanaman melalui mekanisme penekanan patogen atau melarutkan fosfat (Seiler *et al.*, 2013; Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

Hasil ITS (gen antara 5.8S dengan 28S rRNA) dari cendawan C78 menunjukkan bahwa gen tersebut memiliki panjang 448 bite. Pencocokan pada BLAST menunjukkan bahwa C78 termasuk dalam cendawan genus *Cladosporium*. Spesies yang paling mirip (99%) adalah *Cladosporium cladosporioides*. *Cladosporium* dicirikan dengan struktur badan buah yang unik seperti mahkota yang retak (*coronate scar*). Genus ini sangat umum, kosmopolitan, saprofit, dan bisa diisolasi dari udara, tanah, kain, substrat lain, dan juga umum sebagai endofit. Dua spesies *Cladosporium*, yaitu *C. oxysporum* dan *C. sphaerospermum* diisolasi sebagai endofit dari tanaman pinus (*Pinus* spp.), sementara, *Cladosporium* sp. diisolasi dari tanaman mentimun (*Cucumis sativus*) yang diketahui memiliki potensi sebagai *plant growth promotion*. *Cladosporium* sp. Dari mentimun menghasilkan giberelin yang jumlahnya lebih banyak dibanding *Fusarium fujikuroi* tipe liar (Bensch *et al.*, 2010; Hamayun *et al.*, 2010; Paul dan Yu, 2008).

Hasil analisa kemampuan menghasilkan hormon pertumbuhan dari ketiga isolat terpilih ditampilkan pada Tabel 4. Ketiga isolat terpilih mampu menghasilkan hormon pertumbuhan auksin, sitokinin, dan juga giberelin.

Bakteri N12 menghasilkan hormon yang cenderung lebih banyak dibanding L16 dan C78. Sementara, L16 menghasilkan auksin, zeatin, dan giberelin yang cenderung lebih banyak dibanding C78.

### SIMPULAN

Sebanyak 3 isolat endofit yang diperoleh dari lima varietas tebu di GMP mampu meningkatkan pertumbuhan tebu sehingga berpotensi dikembangkan sebagai agen hayati pemacu pertumbuhan. Ketiga isolat tersebut adalah bakteri *Bacillus safensis* (N12) yang diisolasi dari akar varietas GMP3, bakteri *Domibacillus robiginosus* (L16) yang diisolasi dari daun varietas GMP3, serta cendawan *Cladosporium cladosporioides* (C78) yang diisolasi dari batang varietas PS48. Ketiga isolat tersebut mampu memproduksi hormon pertumbuhan auksin, sitokinin, dan juga giberelin dengan kecenderungan *Bacillus safensis* lebih baik dibanding dua spesies lainnya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Balint, M., P. Tiffin, B. Hallstrom, R.B. O'Hara, M.S. Olson, J.D. Fankhauser, M. Piepenbring and I. Schmitt. 2013. Host genotype shapes the foliar fungal microbiome of balsam poplar (*Populus balsamifera*). *Plos one*, 8:1-9.
- Bensch, K., J.Z. Groenewald, J. Dijksterhuis, M. Starink-Willemse, B. Andersen, B.A. Summerell, H.D. Shin, F.M. Dugan, H.J. Schroers, U. Braun and P.W. Crous. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology*, 67:1-94. Doi:10.3114/sim.2010.67.01.
- Bertalan, M., R. Albano, V. de Pádua, L: Rouws, C. Rojas, A. Hemerly, K. Teixeira, S. Schwab, J. Araujo and Oliveira. 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10:1-17.
- Favaro, L.C.L., F.L.S. Sebastianes and W.L. Araujo. 2012. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *Plos One*, 7:1-10.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research* (2<sup>nd</sup> Ed.). John wiley and sons, New York. 680 pp.
- [GMP] PT Gunung Madu Plantations. 2011. Tim peneliti GMP: *Usulan pelepasan varietas tebu unggul harapan RGM99-515 dan RGM99-599 spesifik lokasi lahan kering ultisol beriklim tropis basah*. PT Gunung Madu Plantations, Lampung. 17 pp.
- [GMP] PT Gunung Madu Plantations. 2012. *Buku pedoman teknis budidaya tebu di GMP tahun 2012/2013*. PT Gunung Madu Plantations, Lampung. 43 pp.

- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee and J.W. Klopper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 43:895-914.
- Hamayun, M., S.A. Khan, A.L. Khan, G. Rehman, Y.H. Kim, I. Iqbal, J. Hussain, E.Y. Sohn and I.J. Lee. 2010. Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Mycologia*, 102:989-95. Doi: 10.3852/09-261.
- Hidayati, U. 2014. Potensi bakteri endofit asal tanaman karet sebagai pemacu pertumbuhan bibit batang bawah tanaman karet (*Hevea brasiliensis* müll. Arg.) [Disertasi]. IPB. Bogor.
- Hudson, A.O., N.H. Ahmad, R. van Buren and M.A. Savka. 2010. Sugarcane and grapevine endophytic bacteria: Isolation, detection of quorum sensing signals and identification by 16S v3 rDNA sequence analysis In A. Mendez-Vilas (Eds.). Current Research, Technology and Education Topic in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. *Formatex*: 801-806.
- [ICBB] Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology. 2016. Laporan hasil uji analisa No: ICBB.LHP.XII.2016.0996-0999. Bogor.
- Lateef, A., I.A. Adelere and E.B.G. Kana. 2015. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia*, 70:411-419. Doi: 10.1515/biolog-2015-0062.
- Loiret, F.G., E. Ortega, D. Kleiner, P. Ortega-Rodes, R. Rodes and Z. Dong. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J. Appl. Microb.*, 97: 504-511.
- Mandic-Mulec, I., P. Stefanic and J.D. van Elsas. 2015. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectrum* 3:TBS-0017-2013. Doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013.
- Matsuoka, S., and R. Stolf. 2012. Sugarcane tillering and ratooning: key factor for profitable cropping. In J.F. Goncalves and K.D. Correia (Eds.). Sugarcane: Production, Cultivation and Uses. Nova Sci. Publ. p. 137-157.
- Mendes, R., A.A. Pizzirani-Kleiner, W.L. Araujo and J.M. Raaijmakers. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microb.*, 73:7259-7267.
- Ming, R., P.H. Moore, K.K. Wu, A. D'Hont, J.C. Glaszmann and T.L. Tew. 2006. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. *Plant Breeding Reviews*, 27:15-118.
- Njoloma, J.P., M. Oota, K. Taroura, Y. Saeki, and S. Akao. 2006. Colonization ability of *Herbaspirillum* spp. B501gfp1 in sugarcane, a non-host plant in the presence of indigenous diazotrophic endophytes. *Afr. J. Biotech.*, 5:836-841.
- Paul, N.C., and S.H. Yu. 2008. Species of endophytic *Cladosporium* in pine trees in Korea. *Mycobiology*, 36:211-216.
- Seiler, H., M. Wenning, and S. Scherer. 2013. *Domibacillus robiginosus* gen. nov., sp. nov., isolated from a pharmaceutical clean room. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63:2054-61. Doi: 10.1099/ij.s.0.044396-0.
-