

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tumbuhan berbunga di Indonesia merupakan sebagian kecil dari seluruh jenis tumbuhan berbunga di dunia. Jumlah tersebut menempatkan Indonesia pada posisi ketujuh terbesar dengan berbagai jenis mencapai 20.000, dan 40% dari tanaman tersebut adalah tumbuhan lokal. (Kusmana dan Hikmat., 2015). Kemenyan (*Styrax paralleloneurus*) adalah spesies tumbuhan berbunga lokal yang berasal dari Sumatera Utara yang biasa disebut dengan Kemenyan Toba (Iswanto *et al.*, 2021) Tumbuhan kemenyan memiliki kandungan resin terbesar di dunia. Resin tersebut mengandung metabolit sekunder yang sejak lama dimanfaatkan dalam farmasi, industri dan makanan (Lenny Anwar dan Futra, 2019).

Senyawa bioaktif berupa metabolit sekunder yang dapat diproduksi oleh mikroorganisme. Mikroorganisme berupa mikroba endofit berada di dalam jaringan tanaman. Bakteri endofit akan mendapatkan makanan dari tanaman inang dikarenakan terjadinya simbiosis mutualisme dengan tanaman inang (Zulkifli *et al.*, 2018).

Bakteri endofit dapat berperan meningkatkan ketahanan suatu tanaman terhadap suatu serangan bakteri atau jamur lainnya (Fajri *et al.*, 2015). Bakteri endofit dapat ditemukan pada jaringan yang terdapat di setiap organ tanaman (Fithiyah, 2015). Bakteri endofit memiliki kemampuan untuk menambat nitrogen, melarutkan fosfat, menghasilkan fitohormon seperti hormon *indole acetic acid* (IAA), giberelin dan sitokinin. Selain itu mereka juga berfungsi sebagai agen antimikroba.

Tanjung *et al.*, (2015) dalam penelitiannya berhasil mengisolasi tumbuhan baru dan telah diuji kemampuannya untuk menghasilkan IAA sebanyak 2

isolat pada bagian kulit batang. Penelitian Ji *et al.*, (2013) mendapatkan hasil 4 bakteri endofit pelarut fosfat dari bagian daun, batang dan akar padi (*Oryza sativa*). Damanik dan Rizkita (2021) telah melakukan isolasi fungi endofit dari tanaman kemenyan yang berhasil diisolasi yaitu 14 isolat fungi endofit. Hingga saat ini belum ada laporan penelitian tentang isolasi bakteri endofit pada tumbuhan kemenyan, oleh sebab itu penelitian ini penting untuk dilakukan.

B. Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini yaitu :

1. Informasi hanya seputar bakteri endofit yang diteliti
2. Informasi yang disajikan yaitu: data hasil isolasi, hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis, uji bakteri penghasil hormon IAA, uji bakteri pelarut fosfat, hasil identifikasi molekuler dan analisis filogenetik.

C. Rumusan Masalah

Perumusan masalah pada penelitian ini meliputi:

1. Bagaimanakah hasil isolasi bakteri endofit batang kemenyan (*Styrax paralleloneurus*)?
2. Bagaimanakah hasil karakterisasi bakteri endofit batang kemenyan (*Styrax paralleloneurus*)?
3. Bagaimanakah hasil identifikasi bakteri endofit potensial batang kemenyan (*Styrax paralleloneurus*)?

D. Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini meliputi:

1. Untuk mengisolasi bakteri endofit batang kemenyan (*Styrax paralleloneurus*)

2. Untuk menjelaskan karakteristik bakteri endofit batang kemenyan (*Styrax paralleloneurus*)
3. Untuk mengidentifikasi bakteri endofit potensial batang kemenyan (*Styrax paralleloneurus*)

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoretis

Penelitian ini diharapkan untuk menjadi salah satu informasi kebaruan dalam penelitian tentang isolasi dan karakterisasi bakteri endofit potensial batang kemenyan bagi masyarakat, mahasiswa, referensi Universitas Islam Negeri Sultan Maulana Hasanuddin Banten khususnya Fakultas Sains & Teknologi dan juga sebagai rujukan untuk menambah pengetahuan bagi penelitian berikutnya.

2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat memberikan rujukan kepada para petani mengenai penggunaan biofertilizer berbasis bakteri endofit dalam pengelolaan pertanian /perkebunan.

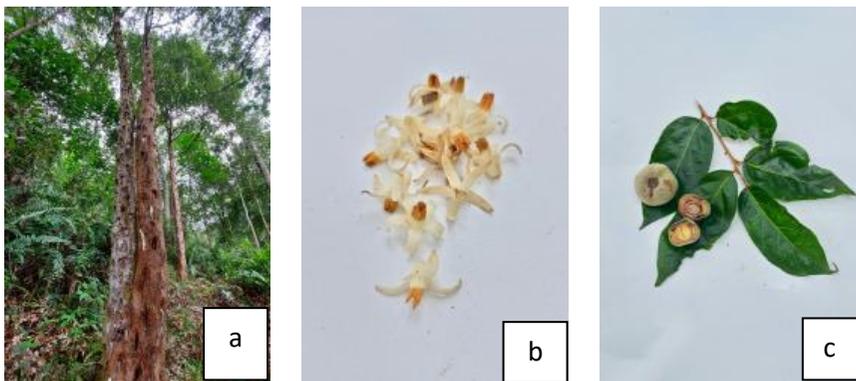
BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Tumbuhan Kemenyan

Tumbuhan kemenyan merupakan bagian dari 130 spesies pohon kecil yang termasuk dalam famili *Styracaceae*. Klasifikasi ilmiah tanaman kemenyan adalah kingdom Plantae, divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, ordo Ebenales, famili Styracaceae, genus *Styrax* dan spesies *Styrax paralleloneurus* (Pasaribu *et al.*, 2013.)



Gambar 2. 1 Tumbuhan Kemenyan Keterangan: (a) bagian batang, (b) bagian bunga dan (c) bagian daun (*Styrax Paralleloneurus*, 2014)

Tumbuhan Kemenyan merupakan pohon besar yang dapat tumbuh hingga setinggi 24-40 m dengan diameter 60-100 cm. Batangnya lurus dengan sedikit percabangan. Kulit beralur tidak terlalu dalam (3-7 mm) dan merah berwarna anggur (Silalahi *et al*, 2013). Tumbuhan kemenyan memiliki daun tunggal yang tersusun secara spiral. Daunnya berbentuk lonjong dengan pangkal bulat dan ujung yang lancip dengan panjang daun antara 1-18 cm dan lebar antara 2 - 10 cm (Jayusman, 2014). Bunga berwarna putih berbentuk lonceng, tangkai bunga dengan panjang 6 - 11 cm dan termasuk

bunga hermafrodit atau bunga sempurna yaitu memiliki organ reproduksi berupa putik dan benang sari, dan jumlah daun bunga sekitar 4 hingga 5 helai. Buahnya berbentuk pipih, bulat, lonjong yang ditutupi kulitnya yang keras dengan diameter umumnya sekitar 2 sampai 3 cm dan memiliki warna biru karena struktur lapisan luar yang mengembalikan sinar berwarna biru. Biji buahnya memiliki ukuran 1,75-3,1 mm dan berwarna coklat muda yang dibungkus daging keras dan tebal, memiliki bentuk bulat yang berukuran sekitar 15- 19 mm (Sianipar, 2023).

Tumbuhan kemenyan tersebar diseluruh dunia dan sebagian besar ditemukan diwilayah Mediterania yang terletak diantara Asia bagian timur dan Amerika bagian utara, sebagian besar pula spesies tersebut tersebar di Amerika selatan (Jaradat, 2020). Di wilayah Indonesia tumbuhan kemenyan banyak ditemukan di pulau Sumatera (Sianipar, 2023). Provinsi Sumatera Utara merupakan penghasil utama kemenyan yang cenderung tumbuh berkelompok dan sering ditemukan berasosiasi dengan pohon lain (Rahmawati *et al.*, 2023).

Secara alami, kemenyan tumbuh dalam kelompok dan berasosiasi dengan tumbuhan lain dikarenakan jenis tumbuhan yang bersifat toleran dan mempunyai pertumbuhan yang sedikit lambat. Hal ini dapat dilihat dari keberadaanya yang tersebar dan tidak mendominasi di suatu area tertentu. Kemenyan tumbuh dengan baik dibagian atas tanah yang sebagian besar sudah mengalami pelapukan dengan pH tanah berkisar antara 4-7. Tumbuhan ini tumbuh pada ketinggian antara 60-2100 mdpl, sementara di Provinsi Sumatera Utara, ia lebih banyak ditemukan pada ketinggian 800- 1700 mdpl. Jenis tumbuhan ini tidak tahan terhadap genangan, sehingga memerlukan tanah dengan porositas tinggi yang memungkinkan air dengan mudah meresap untuk pertumbuhannya (Silalahi *et al.*, 2013).

Bagian yang paling sering dimanfaatkan dari tumbuhan kemenyan adalah resin atau getah, diperoleh melalui penyadapan pada kulit kayu pohon yang berusia 15-20 tahun (Harahap *et al.*, 2019). Resin kemenyan diketahui mengandung senyawa aktif yang memiliki potensi untuk digunakan pengobatan berbagai penyakit (Nurwahyuni *et al.*, 2022).

2. Hutan Rakyat

Hutan masyarakat tumbuh pada tanah milik masyarakat yang pengelolaannya dijalankan oleh masyarakat itu sendiri. Eksistensi hutan masyarakat telah mengubah pandangan masyarakat mengenai pengelolaan hasil hutan non-kayu (Purba *et al.*, 2017). Menurut Peraturan Menteri lingkungan Hidup dan Kehutanan (PERMENHUT) NO. P. 35 tahun 2007 hasil hutan non-kayu didefinisikan sebagai produk hayati dari hutan baik nabati maupun hewani termasuk kecuali kayu. Peraturan ini mendefinisikan bahwa Indonesia memiliki sekitar 557 hasil hutan non-kayu yang dikategorikan kedalam kelompok tumbuhan dan tanaman serta kelompok hewan (Hutapea *et al.*, 2022).

Salah satu hasil hutan non-kayu yang paling sering masyarakat manfaatkan adalah resin yang terdapat pada kemenyan, hal ini dapat diamati dari luasnya kebun kemenyan yang tersebar di berbagai daerah Humbang Hasundutan Sumtera Utara (Purba *et al.*, 2017). Tumbuhan kemenyan memiliki nilai ekonomi yang signifikan. Pengelolaan kemenyan di Sumatera Utara telah dilakukan masyarakat lokal sejak tahun 1800-an. Kemenyan diekspor ke berbagai negara dengan Singapura sebagai salah satu tujuan utamanya. Salah satu produk yang paling terkenal adalah resin (Hutapea *et al.*, 2022).

3. Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang hidup dan mengkolonisasi jaringan tanaman dalam hubungan simbiosis mutualisme. Tanaman berfungsi sebagai inang bagi bakteri ini yang menghasilkan metabolit untuk meningkatkan penyerapan nutrisi, merangsang pertumbuhan, meningkatkan biomassa tanaman dan menginduksi resistensi tanaman terhadap patogen (Widowati *et al.*, 2020).

4. Bakteri Penghasil Hormon IAA

Hormon IAA merupakan auksin endogen yang berfungsi dalam pembesaran sel, menghambat pertumbuhan tunas samping, merangsang proses absisi, berperan dalam pembentukan jaringan xilem dan floem, serta mempengaruhi perkembangan dan pemanjangan akar. Hormon IAA memainkan peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sehingga produksi oleh bakteri tertentu dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman (Herlina *et al.*, 2016). Hormon IAA dapat dihasilkan oleh bakteri endofit. Endosimbiosis terjadi ketika bakteri endofit telah membentuk koloni dalam jaringan tanaman memproduksi hormon IAA (Arifiani dan Lisdiana, 2021).

5. Bakteri Pelarut Fosfat

Fosfat adalah sumber nutrisi yang paling besar pada tanah yang sangat dibutuhkan oleh pertumbuhan dan perkembangan tanaman, akan tetapi kesediaan fosfat terlarut pada tanah dianggap kurang dikarenakan cenderung terikat dengan mineral tanah sehingga membentuk fosfat kompleks (Khan *et al.*, 2022). Menurut Larasati *et al.*, (2018) tanaman hanya menyerap sekitar fosfat 10-30% dari fosfat yang diberikan, oleh dari itu, guna menjamin ketersediaan fosfat bagi tanaman sangat membutuhkan bakteri pelarut fosfat (Lestari *et al.*, 2023).

Bakteri pelarut fosfat berperan dalam penyuburan tanah karena mampu melakukan mekanisme eksresi asam organik yang memiliki berat molekul rendah. (Fadhilah *et al.*, 2015). Pemenuhan kebutuhan P dengan memanfaatkan bakteri pelarut fosfat sudah cukup banyak dikembangkan dan terbukti sangat efektif dalam melarutkan unsur hara P, terutama pada tanah masam dan basa yang mengalami fiksasi P yang tinggi oleh oksida Al, Fe dan Ca. Penggunaan bakteri pelarut fosfat diperkirakan dapat mengurangi masalah P pada tanah masam (Herman dan Pranowo, 2013).

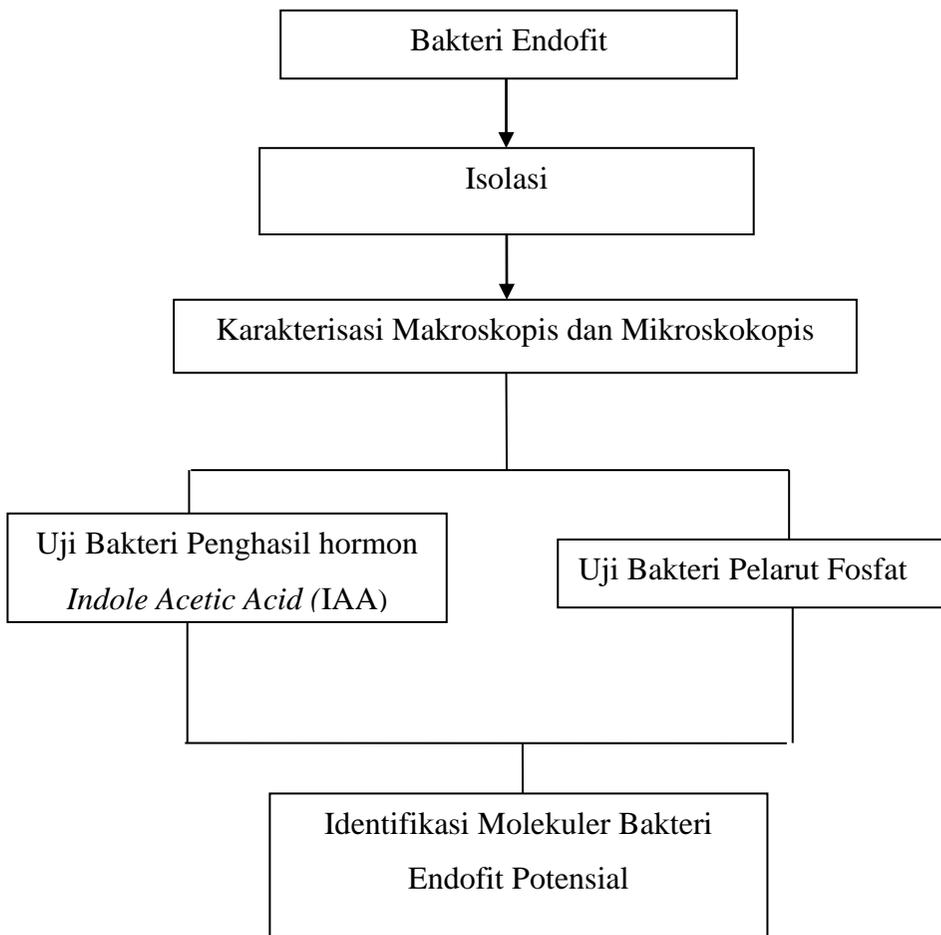
B. Hasil Penelitian yang Relevan

1. Hasil penelitian Basri (2016) dalam penelitiannya tentang isolasi dan identifikasi molekuler bakteri endofit pada tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*) memperoleh hasil 3 isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi. Karakterisasi makroskopis meliputi ukuran, bentuk, elevasi, tepian dan permukaan serta hasil identifikasi molekuler bakteri endofit pada amplifikasi menggunakan Kit GenJET Genomic DNA Purification kit. Dari hasil elektroforesis diperoleh terpisah dan setara dengan marker 1000 bp. Analisis sekuensing dikirimkan ke PT. *Genetika Science* Indonesia menggunakan gen 16s rRNA dan diperoleh hasil yaitu isolat E1 dan E2 memiliki kesesuaian dengan *Bacillus sp* dan isolat E3 memiliki kesesuaian dengan *Bacillus pumilus*.
2. Penelitian Aji dan Lestari (2020) tentang bakteri endofit pada tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai penghasil Asam Indol Asetat (AIA) memperoleh hasil 12 isolat yang terdiri dari 4 isolat yang berasal dari daun, 4 isolat dari batang, dan 4 isolat diperoleh dari akar dan seluruh isolat dapat memproduksi hormon AIA.

3. Penelitian Wibowo *et al.*, (2022) tentang kemampuan bakteri endofit pelarut fosfat dari tumbuhan akar kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) Asal Pulau Enggano, Provinsi Bengkulu memperoleh hasil isolasi bakteri endofit yang berasal dari akar, batang dan daun pada tumbuhan akar kuning menghasilkan total 18 bakteri endofit. Dari total 18 isolat bakteri endofit, 8 diantaranya memiliki kemampuan melarutkan fosfat.

C. Kerangka Berpikir

Bakteri endofit adalah bakteri yang tumbuh dan mengkolonisasi tanpa merugikan tanaman inang. Bakteri endofit memiliki perbedaan dan bervariasi yang dapat dianalisis melalui karakterisasi morfologis. Pada penelitian ini sampel yang dipilih yaitu batang kemenyan. Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu mengisolasi selanjutnya dilakukan pemurnian untuk memperoleh isolat tunggal. Isolat tunggal bakteri endofit tersebut kemudian dikarakterisasi berdasarkan karakter makroskopis dan mikroskopis dilakukan uji bakteri penghasil hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) serta uji kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat. Tahapan terakhir adalah melakukan identifikasi molekuler bakteri endofit potensial.



Gambar 2.2 Gambar Kerangka Berpikir

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan bulan Februari tahun 2023 hingga bulan Juni tahun 2024 di Laboratorium Genomik Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) di Cibinong, Bogor – Jawa Barat.

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang menjadi fokus penelitian ini yaitu tumbuhan kemenyan (*Stryax paralleloneurus*), sedangkan sampel yang digunakan bagian batang yang diambil langsung dari KPH wilayah 13 Dolok Sanggul, Humbang Hasundutan, Provinsi Sumatera Utara.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu laminar, autoklav, *aluminium foil*, spatula, plastik wrap, timbangan analitik, kertas timbangan, *colony counter*, *microwave*, inkubator, ose, pinset, gelas beaker, *tissue*, pisau, objek kaca, tusuk gigi, *microtube*, conical tube, tip biru, tip ukuran 0,2-10 μ l, sarung tangan, masker, mikroskop binokuler, elektroforesis, *shaker incubator*, sentrifugator, spektrofotometri Shimadzu UV-1800, penggaris, mikropipet, *vortex*, studio foto dan alat tulis.

Bahan dalam penelitian ini meliputi Media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), *Nystatin*, akuades steril, *tissue* steril, sodium hipoklorit, PCR mix (*My taq*, 1942 R, 27 F, NFW), KOD one PCR Master Mix, agarosa, buffer TAE (*Tris Acetate EDTA*), *florosafe* DNA stain, 1kb DNA *Ladder*, *tryptophan*, reagen *Salkowsky*, media *pikovskaya's*, pereaksi pewarna P pekat.

D. Jenis Metode Penelitian

Metode penelitian ini yaitu eksplorasi menggunakan pendekatan kualitatif deskriptif. Terdapat beberapa tahapan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi isolasi, karakterisasi dan identifikasi bakteri endofit potensial batang kemenyan yang berpotensi sebagai biostimulan tanaman. Uji potensi bakteri endofit sebagai biostimulan tanaman dilakukan melalui uji penghasil hormon IAA dan uji bakteri pelarut fosfat. Masing-masing pengujian terdiri dari uji kualitatif dan kuantitatif.

E. Teknik Pengumpulan Data

Data pada penelitian ini adalah data asli yang dikumpulkan dari observasi langsung terhadap sampel. Data terdiri dari hasil isolasi, karakterisasi dan identifikasi molekuler. Teknik yang dilakukan dalam pengumpulan data diantaranya:

1.) Isolasi Bakteri

Sampel diperoleh dari KPH wilayah 13 Dolok Sanggul, Humbang Hasundutan, Provinsi Sumatera Utara yaitu batang yang disadap dan tidak disadap. Bagian yang menjadi sampel batang yang ditanam pada media NA. Langkah-langkah isolasi diawali dengan memotong sekitar 1 cm batang tumbuhan kemenyan, selanjutnya dicuci dengan air 10 menit. Sampel dimasukan kedalam laminar kemudian disterilisasi permukaan. Sterilisasi dilakukan dengan merendam bagian batang dalam alkohol 75% selama 1 menit. Setelah itu, sodium hipoklorit selama 5 menit, alkohol 75% selama 30 detik, dan dibilas dengan akuades sebanyak 2-4 kali dan dikeringkan pada *tissue* steril. Aquades dari bilasan terakhir digunakan sebagai kontrol yang ditumbuhkan kedalam media NA pada cawan petri, tujuannya untuk mengetahui apakah proses sterilisasi sudah dilakukan dengan benar. Setelah kering batang dipindahkan ke cawan petri steril untuk dipotong

menggunakan pisau steril dan ditanam pada media NA cawan petri yang telah dicampur dengan anti fungal lalu diinkubasi pada suhu 28 °C-30 °C selama 2-3 hari.

2.) Pemurnian Bakteri

Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode *streak kuadran*. Kultur ditumbuhkan pada suhu inkubasi 28 °C-30 °C. Pemurnian dilakukan berulang hingga mendapatkan koloni tunggal. Isolat yang telah murni kemudian dipindahkan pada media agar miring tujuannya untuk memperbanyak stok bakteri (Pratiwy *et al.*, 2022).

3.) Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi dilakukan dengan mengamati isolat tunggal dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi secara makroskopis dilakukan dengan cara melihat langsung isolat yang terdiri dari warna, bentuk, tepian dan elevasi dari isolat. Selanjutnya karakterisasi mikroskopis dilakukan menggunakan teknik Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengkarakterisasi bakteri endofit secara mikroskopis. Isolat yang digunakan merupakan isolat murni berusia 1 hari. Kaca objek dibersihkan menggunakan alkohol 95%. Isolat bakteri dioles tipis pada kaca objek menggunakan jarum ose dan ditetaskan dengan akuades steril sebanyak 1 tetes. Kristal violet kemudian ditetaskan hingga menutupi seluruh permukaan sampel pada objek kaca. Sampel didiamkan selama 30-60 detik pada suhu ruangan lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 detik. Kemudian ditetaskan lugol. Selanjutnya dilakukan pencucian warna atau dekolorisasi menggunakan alkohol selama 5 detik dan dibilas kembali menggunakan air selama 5 detik untuk menghilangkan aktivitas dekolorisasi, terakhir ditetesi safranin dan didiamkan selama 1 menit dan dibilas air selama 5 detik kemudian dikeringanginkan. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop untuk melihat hasil pewarnaan bakteri.

4.) Uji Penghasil Hormon *Indole Acetic Acid* (IAA)

Kurva standar IAA dibuat dengan metode pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dengan larutan stok L-tryptophan 40 ppm. Sebanyak 2 mL larutan IAA pada setiap konsentrasi ditambahkan 2 mL reagen Salkowsky, lalu diinkubasi pada ruang gelap selama 60 menit. Larutan standar IAA dihitung menggunakan Spektrofotometer Shimadzu UV-1800 dengan panjang gelombang 530 nm.

Bakteri endofit diinokulasikan dalam 5 mL medium NB yang telah ditambahkan 0,1 mL L-tryptophan, kemudian dishaker selama 48 jam. Kultur sebanyak 2 ml disentrifugasi selama 10 menit dengan suhu 4°C. Kultur kemudian ditambahkan dengan larutan *Salkowsky* (H_2SO_4 , 1,5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, akuades) sebanyak 2 ml dan diinkubasi. Selanjutnya dihitung nilai absorbansi menggunakan Spektrofotometer Shimadzu UV-1800 panjang gelombang 530 nm. Sebagai blanko adalah 2 mL media NB yang ditambahkan 2 mL *Salkowsky*. Perubahan warna merah muda yang terjadi menunjukkan positif penghasil IAA (Noviyanti dan Rahayu, 2023).

Menurut Suwarni dan Advinda (2021), konsentrasi IAA dihitung dengan persamaan kurva standar pada rumus (1).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Keterangan:

y = Variabel dependen (absorban)

x = Variable independen (konsentrasi)

a = konstanta

b = Koefisien

5.) Uji Pelarut Fosfat

Uji bakteri endofit pelarut fosfat secara kualitatif dilakukan dengan cara total langsung dalam media *Pikovskaya's* (Wibowo, 2022). Isolat bakteri murni dipindahkan di medium *Pikovskaya's* (*Pikovskaya's* agar dan akuades) dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30 °C. Isolat yang positif melarutkan fosfat dapat dilihat adanya zona bening pada media (Fadhilah *et al.*, 2015). Menurut Asril dan Lisafitri (2020) zona bening yang muncul di sekitar koloni kemudian diukur dan dihitung untuk menentukan indeks kelarutan fosfat pada setiap koloni menggunakan rumus indeks kelarutan fosfat (2).

$$IP: \frac{\text{diameter zona bening-diameter koloni bakteri}}{\text{diameter koloni}} \quad (2)$$

Pengujian kemampuan isolat endofit untuk melarutkan fosfat secara kuantitatif dilakukan dengan cara 1 ose bakteri diinokulasikan kedalam 10 ml media *pikovskaya's* cair. Inkubasi biakan dilakukan pada suhu 28°C dengan 150 rpm. Selanjutnya kultur disaring untuk memisahkan sisa (Ca_3PO_4) kedalam *falcon tube*. Kemudian kultur disentrifugasi dilakukan pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Kultur ditambahkan sebanyak 1 mL pereaksi pewarna P pekat dan larutan hidrazin sulfat sebanyak 0,5 mL kemudian didiamkan selama 30 menit. Pengukuran fosfat terlarut menggunakan metode Mardiyansyah dan Trimulyono (2021) jumlah fosfat terlarut diukur dengan Spektrofotometer Shimadzu UV-1800 dengan panjang gelombang 830 nm. Perhitungan konsentrasi bakteri pelarut fosfat dibandingkan dengan kurva standar dengan rumus persamaan regresi. Pembuatan Kurva standar dibuat menggunakan metode pengenceran yaitu kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dilarutkan dengan akuades kemudian

dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 10 ppm. Larutan natrium moblidat sebanyak 1 mL ditambahkan kedalam 5 mL berbagai konsentrasi KH_2PO_4 . Kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan hidrazin sulfat, selanjutnya larutan dipanaskan selama 30 menit didalam waterbath dan diukur menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV-1800.

6.) Identifikasi Molekuler dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

a. Isolasi DNA

Isolat tunggal yang telah terpilih dipurifikasi dan diinkubasi selama 1 hari. Masing-masing isolat dimasukkan ke dalam microtube sebanyak 2 ulangan. Kemudian sampel dalam microtube dipanaskan pada microwave dengan suhu $\pm 50^\circ\text{C}$ selama 15 detik. PCR mix dibuat menggunakan gen 16S rRNA dengan primer 1492 R μL dan 27 F. Untuk mengetahui keberadaan DNA menggunakan dua campuran PCR master mix yaitu *My tag Hs Pro* 5 μL 1492 R 0,5 μL , 27 F 0,5 μL *Nuclease Free Water* (NFW) 19 μL dan KOD one PCR Master Mix 12,5 μL , 1492 R 0,75 μL , 27 F 0,75 μL , NFW 11 μL dengan total volume masing-masing 25 μL . PCR mix dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi sampel kemudian diamplifikasi. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 dengan suhu 4°C .

b. Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk membuktikan kualitas dari hasil amplifikasi dengan gel agarosa. Agarosa 0,8% ditimbang sebanyak 0,32 gram dan dilarutkan dengan 40 ml *buffer* TAE (*Tris Acetate EDTA*). Agarosa dipanaskan di dalam *microwave* sampai larut kemudian ditunggu sampai suhu tidak terlalu panas. *Florosafe* DNA stain ditambahkan ke dalam larutan agarosa sebanyak 1,5 μL kemudian dihomogenkan dengan cara diaduk. Larutan dituang ke dalam cetakan yang sudah dipasangkan sisir dan didiamkan sampai memadat. Agarosa dimasukkan ke dalam alat

elektroforesis dan larutan *buffer* TAE dituang secara perlahan sampai agarosa terendam. Sampel DNA sebanyak 4 μ L dimasukkan pada setiap sumur dengan menggunakan marker 4 μ L. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt selama 25 menit. Lapisan gel hasil dari elektroforesis akan diamati pada alat *Gel Doc*.

c. Sekuensing dan Identifikasi

Hasil PCR kemudian disekuensing dengan dijasakan ke *Genetica Science*. Hasil sekuensing kemudian diidentifikasi menggunakan aplikasi bioedit dan dilakukan BLAST secara online di www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. untuk melihat informasi mengenai organisme atau bakteri apa yang memiliki kesamaan dengan sekuen di Genbank.

d. Analisis Pohon Filogenetik

Analisis filogenetik adalah metode yang digunakan untuk mempelajari hubungan evolusi antara berbagai organisme. Menurut Lestari *et al.*, (2018) analisis ini bertujuan untuk memvalidasi data karakter morfologi dalam proses identifikasi spesies yang sudah dilakukan. Analisis hubungan kekerabatan terdekat berdasarkan pohon filogenetik menggunakan software MEGA XI (Lestari, 2023).

7.) Teknik Analisis Data

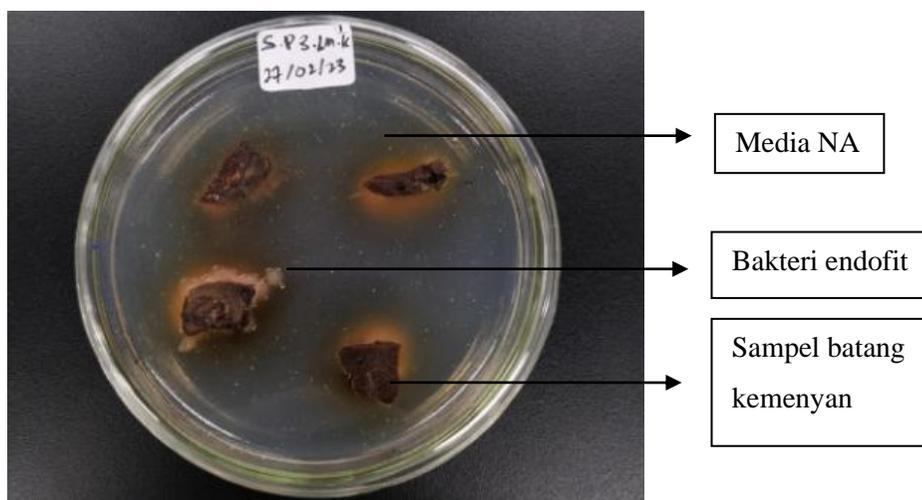
Analisis data potensi bakteri endofit batang tumbuhan kemenyan sebagai biostimulan tanaman dilakukan dengan analisis data primer yang bersifat deskriptif dengan mendeskripsikan hasil isolasi, pengamatan makroskopis dan mikroskopis uji penghasil hormon IAA, uji bakteri pelarut fosfat. Selanjutnya bakteri potensial dilakukan identifikasi menggunakan *software* bioedit dan dilakukan BLAST secara online di www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, kemudian analisis hubungan kekerabatan terdekat berdasarkan pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA XI.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Batang Kemenyan

1. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit



Gambar 4.1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit Batang Kemenyan (*Styrax paraleloneurus*)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap bakteri yang diisolasi dari tumbuhan kemenyan (Gambar 4.1), menunjukkan bahwa isolat tumbuhan kemenyan diperoleh 23 isolat. Hasil pengamatan makroskopis disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Pengamatan Makroskopis Isolat Bakteri Endofit Batang Kemenyan (*Styrax Paralelloneurus*).

Kode Isolat	Bentuk	Elevasi	Margin	Warna
TS.P3.LM 1	Circular	Flat	Entire	Kuning
TS.P3.LM 2	Circular	Flat	Entire	Kuning
TS.P3.LM 3	Circular	Flat	Entire	Putih

Kode Isolat	Bentuk	Elevasi	Margin	Warna
TS.P3.LM 4	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	Kuning
TS.P3.LM 5	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
TS.P3.LM 6	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
TS.P3.LM 7	<i>Rhizoid</i>	<i>Flat</i>	<i>Lobate</i>	Putih
S.P3.LM.K 1	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Kuning
S.P3.LM.K 2	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.K 3	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Putih
S.P3.LM.K 4	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Kuning
S.P3.LM.K 5	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.K 6	<i>Irreguler</i>	<i>Convex</i>	<i>Undulate</i>	Kuning
S.P3.LM.K 7	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Kuning
S.P3.LM.K 8	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.K 9	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Kuning
S.P3.LM.K 10	<i>Irreguler</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.NK 1	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.NK 2	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.NK 3	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.NK 4	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih
S.P3.LM.NK 5	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Kuning
S.P3.LM.NK 6	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Kuning

Keterangan: TS= Tidak Sadap; S= Sadap; P3= nomor pohon; LM= Lahan masyarakat; K= koak atau area yang disadap pada pohon NK= non koak atau area yang tidak disadap pada pohon.

Berdasarkan pengamatan secara makroskopis pada Tabel 4.1 diketahui bahwa isolat bakteri endofit diisolasi pada media Nutrient Agar (NA). Media Nutrient Agar (NA) merupakan media yang paling umum digunakan untuk pertumbuhan bakteri (Khaerunnisa *et al.*, 2019). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat yang bervariasi karakteristik yang berbeda yaitu 20 isolat bakteri berbentuk bulat (*circular*), 2 isolat dengan bentuk tidak beraturan (*irregular*), dan 1 isolat dengan bentuk bercabang (*Rhizoid*). Adapun elevasi dari koloni bakteri ada 20 isolat yang datar (*flat*), 2 isolat cembung *convex*, 1 isolat terangkat diatas permukaan agar (*raised*). Tepi dari koloni ada 20 isolat dengan tepi halus (*entire*) 1

isolat dengan tepi berlekuk (*Lobate*) dan 2 isolat dengan tepi bergelombang (*Undulate*). Warna dari setiap isolat bakteri bermacam-macam 13 isolat dengan warna putih dan 10 isolat dengan warna kuning. Perbedaan morfologi setiap isolat ini sesuai dengan penelitian Jurmadin *et al.*, (2018) bahwa pada umumnya bentuk koloni bakteri berbentuk *circular irregular, filamentous, rhizoid*. Elevasi berbentuk *raised, covex, flat, entire, undulate, filiform, curled dan lobate*. Isolat bakteri yang telah murni tersebut diambil dan ditumbuhkan kembali, selanjutnya dilakukan uji potensi bakteri endofit sebagai agen biostimulan tanaman melalui uji penghasil hormon IAA dan uji Bakteri Pelarut Fosfat.

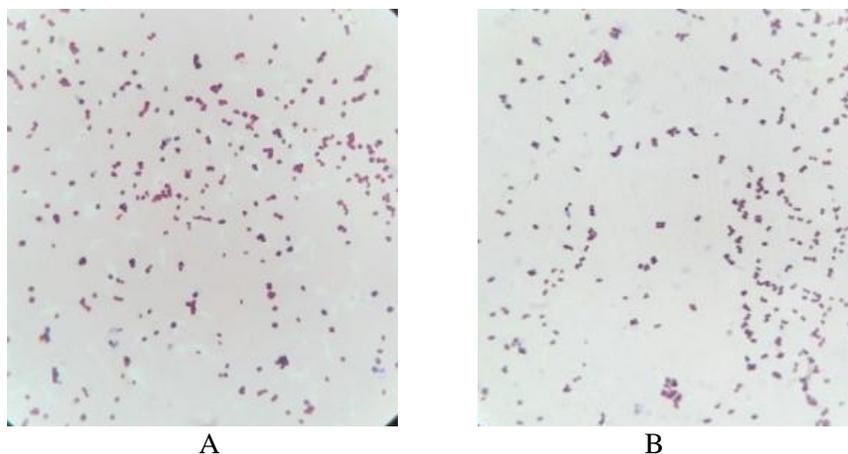
Pengamatan mikroskopis dilakukan menggunakan metode pewarnaan Gram. Tujuan dari pewarnaan Gram pada bakteri endofit dilakukan untuk membedakan jenis bakteri tersebut berdasarkan sifat-sifat dinding selnya dan sifat-sifat fisik serta kimia khas dari bakteri dengan zat warna (Purwaningsih dan Wulandari, 2021). Setelah pewarnaan, bakteri Gram Positif akan terlihat berwarna ungu atau biru, sedangkan bakteri Gram negatif akan terlihat berwarna merah atau merah muda (Suryani dan A'yun, 2022). Adapun hasil pengamatan mikroskopis dapat dilihat pada Tabel 4.2 berikut.

Tabel 4.2. Hasil uji pewarnaan gram bakteri endofit Batang Kemenyan (*Styrax Paralelloneurus*)

Kode Isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
TS.P3.LM.1	Ungu	<i>Coccus</i>
TS.P3.LM 2	Merah	<i>Coccus</i>
TS.P3.LM 3	Merah	<i>Coccus</i>
TS.P3.LM 4	Ungu	<i>Coccus</i>
TS.P3.LM 5	Ungu	<i>Coccus</i>
TS.P3.LM 6	Ungu	<i>Coccus</i>
TS.P3.LM 7	Ungu	<i>Basil</i>
S.P3.LM.K 1	Merah	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.K 2	Ungu	<i>Coccus</i>

Kode Isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
S.P3.LM.K 3	Ungu	<i>Basil</i>
S.P3.LM.K 4	Ungu	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.K 5	Merah	<i>Basil</i>
S.P3.LM.K 6	Merah	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.K 7	Ungu	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.K 8	Merah	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.K 9	Ungu	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.K 10	Ungu	<i>Basil</i>
S.P3.LM.NK 1	Ungu	<i>Basil</i>
S.P3.LM.NK 2	Merah	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.NK 3	Ungu	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.NK 4	Merah	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.NK 5	Merah	<i>Coccus</i>
S.P3.LM.NK 6	Ungu	<i>Coccus</i>

Keterangan: TS= Tidak Sadap; S= Sadap; P3= nomor pohon; LM= Lahan masyarakat; K= koak atau area yang disadap pada pohon NK= non koak atau area yang tidak disadap pada pohon.



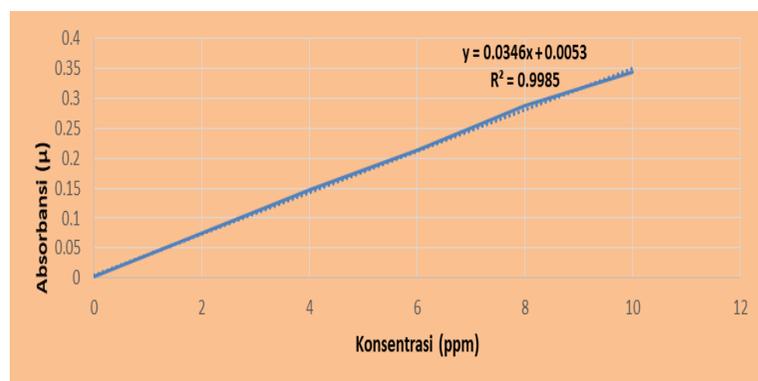
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram Isolat S.P3.LM.K 4 (A) S.P3.LM.NK 6 (B)

Berdasarkan Tabel 4.2, menunjukkan hasil pengamatan mikroskopis terdapat 13 isolat yang termasuk bakteri Gram positif dan 10 isolat bakteri Gram negatif dengan bentuk batang (*basil*) dan bulat (*coccus*). Pada Gambar 4.2 menunjukkan dua isolat terlihat memiliki warna ungu yang menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk bulat (*coccus*). Perbedaan warna tersebut

disebabkan oleh perbedaan komponen penyusun dinding sel antara bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Bakteri gram positif mampu mempertahankan pewarna utama yang mengandung kristal violet karena dinding selnya memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. Sebaliknya, bakteri gram negatif tidak dapat mempertahankan warna utama karena pada dinding selnya terdapat lapisan lipoprotein yang akan larut saat dicuci dengan etanol selama proses pewarnaan Gram (Wulandari dan Purwaningsih, 2019).

2. Uji Penghasil Hormon *Indole Acetic Acid* (IAA)

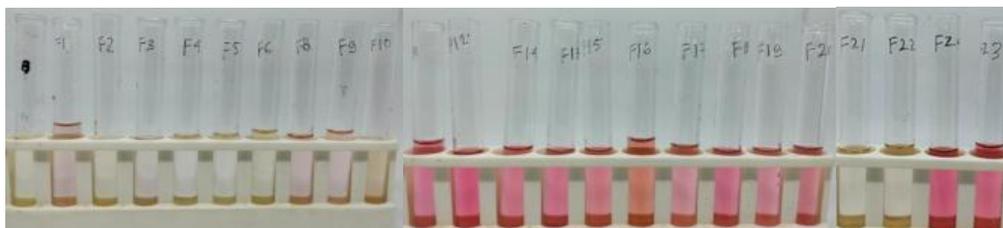
Kurva standar IAA bertujuan untuk menghasilkan persamaan yang dapat digunakan dalam menghitung konsentrasi. Hasil persamaan regresi pada kurva standar IAA yang didapatkan yaitu $y = 0.0346x + 0.0053$ dengan nilai regresi sebesar 0.9985 disajikan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Kurva Standar IAA

Pengujian IAA menunjukkan hasil yaitu variasi warna pada setiap isolat. Kemampuan produksi IAA oleh isolat dapat diamati dari perubahan warna setelah penambahan reagen Salkowsky (Gambar 4.4). Warna merah atau pink menunjukkan bahwa isolat menghasilkan hormon IAA, seperti isolat yang mengalami perubahan warna menjadi pink. Konsentrasi IAA

dihitung menggunakan persamaan kurva standar dan nilai konsentrasi IAA untuk setiap isolat terdapat dalam Tabel 4.3.



Gambar 4.4. Hasil Uji IAA Bakteri Endofit Batang Kemenyan

Tabel 4.3 Konsentrasi IAA Bakteri Endofit Batang Kemenyan (*Styrax Paralleloneurus*)

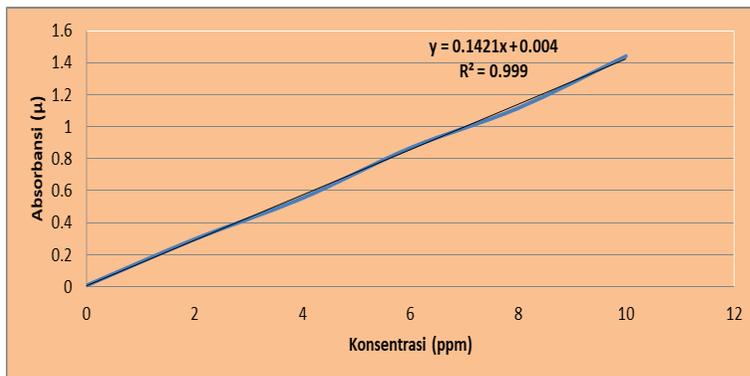
Isolat Bakteri	Konsentrasi IAA (ppm)
TS.P3.LM 1	2.708
TS.P3.LM 2	0.973
TS.P3.LM 3	1.898
TS.P3.LM 4	0.078
TS.P3.LM 5	0.049
TS.P3.LM 6	1.956
TS.P3.LM 7	0.222
S.P3.LM.K 1	2.823
S.P3.LM.K 2	3.286
S.P3.LM.K 3	16.812
S.P3.LM.K 4	26.754
S.P3.LM.K 5	18.690
S.P3.LM.K 6	19.124
S.P3.LM.K 7	14.006
S.P3.LM.K 8	15.713
S.P3.LM.K 9	11.927
S.P3.LM.K 10	19.933
S.P3.LM.NK 1	12.476
S.P3.LM.NK 2	16.841
S.P3.LM.NK 3	1.609
S.P3.LM.NK 4	1.523
S.P3.LM.NK 5	23.026
S.P3.LM.NK 6	26.465

Keterangan: TS= Tidak Sadap; S= Sadap; P3= nomor pohon; LM= Lahan masyarakat; K= koak atau area yang disadap pada pohon NK= non koak atau area yang tidak disadap pada pohon.

Tabel 4.3 menunjukkan 23 isolat bakteri dapat menghasilkan hormon IAA. Adapun nilai konsentrasi IAA yang tertinggi yaitu isolat S.P3.LM.K 4 dengan nilai 26.754 ppm, sedangkan nilai konsentrasi terendah pada kode isolat dengan nilai TS.P3.LM 5 0.049 ppm. Pada isolat dengan konsentrasi IAA tinggi yaitu pada sampel batang yang disadap diduga akibat dari adanya aktivitas fisiologis manusia pada saat melakukan perlakuan pada batang dan isolat ini juga menghasilkan pertumbuhan bakteri endofit dengan cepat sehingga enzim yang diproduksi juga lebih banyak. Hasil pengujian IAA menunjukkan variasi warna pada masing-masing isolat. Hasil pengukuran hormon IAA menunjukkan bahwa produksi IAA oleh setiap isolat bakteri bervariasi hal ini disebabkan oleh sintesis IAA oleh mikroba bergantung pada jalur tryptophan dimana tryptophan berfungsi sebagai prekursor, serta perbedaan dalam jaringan yang memiliki taksonomi beragam dan metabolisme yang beragam (Herlina *et al.*, 2016). Asam amino tryptophan adalah komponen asam amino yang umumnya terdapat dalam protein, sehingga mikroorganisme dapat menggunakannya dengan mudah (Ardiana dan Advinda, 2022).

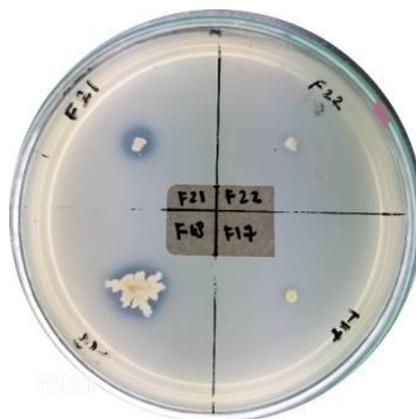
3. Uji Pelarut Fosfat

Kurva standar fosfat dibuat untuk memperoleh persamaan yang dapat digunakan dalam menghitung konsentrasi sampel bakteri pelarut fosfat. Hasil persamaan regresi pada kurva standar fosfat yang didapatkan yaitu $y = 0.1421x + 0.004$ dengan nilai regresi 0.999 disajikan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Kurva Standar Fosfat

Kemampuan bakteri endofit untuk melarutkan fosfat dapat diuji baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Adapun hasil uji kualitatif bakteri endofit dalam melarutkan fosfat dapat dilihat pada Gambar 4.4 yang menunjukkan adanya zona bening disekitar koloni.

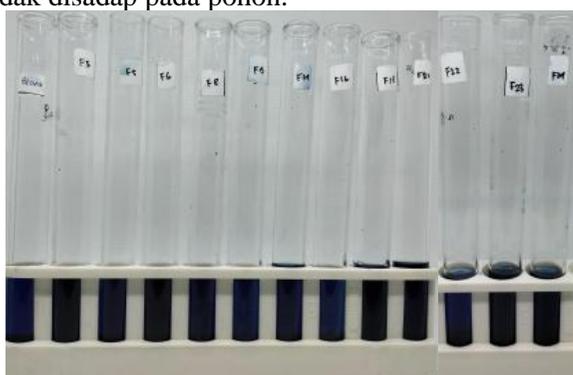


Gambar 4.6 Hasil uji bakteri endofit pelarut fosfat kualitatif

Tabel 4.4 Hasil Pengujian Bakteri Pelarut Fosfat Batang Kemenyang
(*Styrax Paralleloneurus*)

Isolat Bakteri	Diameter zona		Indeks Pelarut Fosfat Kualitatif (IP)	Konsentrasi Fosfat (ppm)
	Diameter koloni (cm)	Diameter bening (cm)		
TS.P3.LM 1	-	-	-	-
TS.P3.LM 2	-	-	-	-
TS.P3.LM 3	0,1	0,9	8	9.563
TS.P3.LM 4	-	-	-	-
TS.P3.LM 5	0,2	0,3	0,5	5.144
TS.P3.LM 6	0,2	0,3	0,5	6.762
TS.P3.LM 7	0,2	0,4	1	3.729
S.P3.LM.K 1	0,6	0,7	0,17	0.562
S.P3.LM.K 2	-	-	-	-
S.P3.LM.K 3	-	-	-	-
S.P3.LM.K 4	-	-	-	-
S.P3.LM.K 5	-	-	-	-
S.P3.LM.K 6	0,1	0,4	3	3.617
S.P3.LM.K 7	-	-	-	-
S.P3.LM.K 8	0,2	0,6	2	0.562
S.P3.LM.K 9	-	-	-	-
S.P3.LM.K 10	0,5	0,6	0,2	3.406
S.P3.LM.NK 1	-	-	-	-
S.P3.LM.NK 2	-	-	-	-
S.P3.LM.NK 3	0,3	0,4	0,33	4.215
S.P3.LM.NK 4	0,1	0,3	2	0.225
S.P3.LM.NK 5	0,3	2,2	6,33	4.356
S.P3.LM.NK 6	0,5	0,6	0,2	24.152

Keterangan: TS= Tidak Sadap; S= Sadap; P3= nomor pohon; LM= Lahan masyarakat; K= koak atau area yang disadap pada pohon NK= non koak atau area yang tidak disadap pada pohon.



Gambar 4. 7. Uji bakteri endofit pelarut fosfat kuantitatif

Pada Tabel 4.4 menunjukkan terdapat 12 isolat bakteri endofit yang melarutkan fosfat uji kualitatif yaitu isolat Isolat bakteri yang memiliki nilai indeks pelarut posfat yang tinggi yaitu isolat TS.P3.LM 3 dengan nilai 8, hasil ini disebabkan bahwa adanya aktivitas enzim fosfatase dan memproduksi tingkat asam organik yang tinggi (Larasati *et al.*, 2018). Situmorang *et al.*, (2015) menyatakan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim yang dihasilkan bakteri pelarut fosfat, semakin besar zona bening yang terbentuk. Zona bening terbentuk akibat proses pelarutan fosfat yang awalnya tidak larut menjadi terlarut oleh bakteri pelarut fosfat dan mampu memproduksi enzim fosfatase. Enzim fosfatase adalah sekelompok enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolitik mineralisasi secara enzimatik dengan mengubah fosfat tidak terlarut menjadi bentuk yang terlarut (Ranjan *et al.*, 2013).

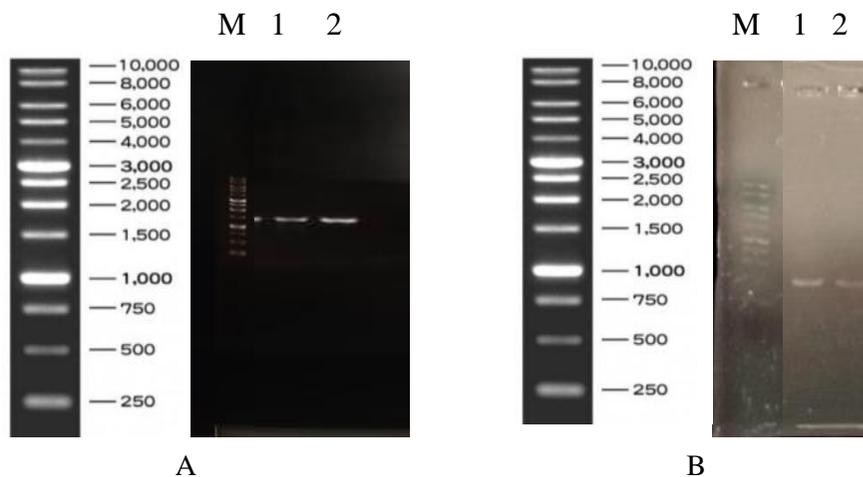
Berdasarkan uji kuantitatif menunjukkan terjadi perubahan warna setelah dipanaskan selama 30 menit, hasil disajikan pada Gambar 4.7. Jumlah fosfat terlarut diukur menggunakan spektrofotometer. Hasil konsentrasi tertinggi terdapat pada isolat S.P3.LM.NK 6 sebanyak 24.152 ppm sedangkan yang terendah konsentrasinya terdapat pada isolat S.P3.LM.NK 4 sebanyak 0.225 ppm, hasil ini merupakan validasi hasil uji kualitatif sebelumnya.

B. Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Potensial Batang Kemenyan (*Styrax paralleloneurus*) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

1. Identifikasi bakteri endofit

Terdapat 2 isolat potensial yang terpilih yaitu isolat kode S.P3.LM.K 4 dan S.P3.LM.NK 6 untuk diidentifikasi secara molekuler

dengan analisis 16S rRNA. Kedua isolat tersebut diseleksi berdasarkan hasil pengujian kemampuan dalam menghasilkan hormon IAA dan bakteri pelarut fosfat yang memiliki konsentrasi yang tinggi pada uji kuantitatif. Menurut Noer (2021) menyatakan bahwa metode identifikasi dengan menggunakan gen 16S rRNA merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan dalam mengidentifikasi bakteri. Selain karena relatif mudah dilakukan dan membutuhkan waktu yang singkat, keberhasilan atau akurasi dari metode ini juga terbukti tinggi. Dalam proses sekuensing, gen yang digunakan bisa berupa gen penuh dengan panjang sekitar 1500 bp atau gen parsial dengan panjang sekitar 500 bp. Adapun hasil PCR atau hasil amplifikasi dari isolat bakteri menggunakan elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.8 Hasil Amplifikasi Elektroforesis Bakteri Endofit

Berdasarkan hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 4.8 terlihat bahwa pita yang terpisah dan sejajar dengan marka memiliki panjang sekitar ± 1500 bp. Hasil tersebut menunjukkan bahwa DNA berhasil teramplifikasi dengan ukuran target yang sesuai. Sampel kemudian disekuensing di laboratorium *Genetika Science*. Tujuan dari proses

sekuensing adalah untuk mengidentifikasi urutan pasangan basa nukleotida pada DNA yang telah berhasil diamplifikasi pada sampel tersebut.

Hasil dari proses sekuensing kemudian diedit menggunakan perangkat lunak BioEdit untuk mendapatkan hasil yang lebih tepat. Hasil analisis Sekuen dibandingkan dengan data yang ada di *Nucleotida Basic Lokal Allignment Search Tool* (BLAST) secara online di www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Informasi yang didapatkan yaitu *Query Cover, Percentage Of Identy, Maximum Score, Dan Expect Value (E-value)*. Hasil dari BLAST mengungkapkan nama bakteri serta tingkat kesamaan urutan nukleotida dibandingkan dengan urutan nukleotida spesies bakteri yang relevan dalam database GeneBank. Adapun hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.5 berikut.

Tabel 4.5 Hasil Identifikasi Bakteri Endofit Batang Kemenyan
(*Styrax Paralelloneurus*)

No	Kode Isolat	Hasil Blast	GeneBank Akses	Quary Cover	% Ident	Max Score	E Value
1.	S.P3.LM.K 4	<i>Microccous aloevera</i>	NR134088.1	100%	98,02%	2394	0,0
2.	S.P3.LM.NK 6	<i>Kocuria palustris</i>	NR026451.1	99%	99,42%	2540	0,0

Keterangan: S= Sadap; P3= nomor pohon; LM= Lahan masyarakat; K= koak atau area yang disadap pada pohon NK= non koak atau area yang tidak disadap pada pohon.

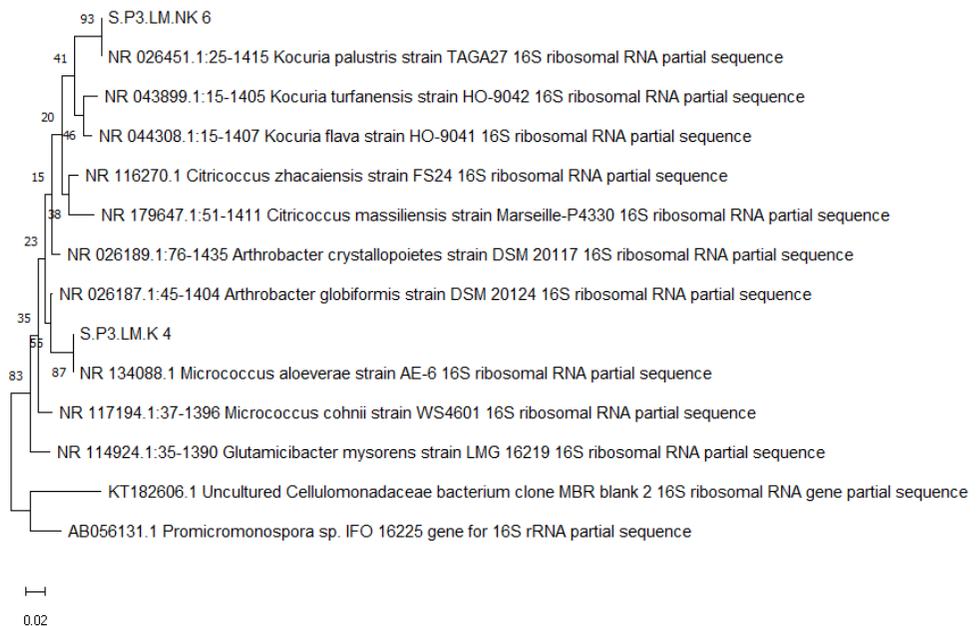
Berdasarkan Tabel 4.5 disajikan urutan teratas hasil penjajaran isolat S.P3.LM.K 4 memiliki kemiripan dengan *Micrococcus aloeverae* dengan *query cover* sebesar 100 %, *percentage of identity* sebesar 98,02%, *max score* sebesar 2394, dan *E-value* 0,0. *Micrococcus aloeverae* merupakan bakteri yang termasuk dalam genus *Micrococcus*. Genus

Micrococcus biasanya ditumbuh pada suhu berkisar 25-37⁰C dan biasanya ditemukan di kulit mamalia, tanah, produk makanan dan udara. *Microcococcus* memiliki bentuk kokus (bulat) dan merupakan bakteri Gram positif (Darwis *et al.*, 2022). Menurut Asghari *et al.*, (2019) pada penelitiannya menyatakan bahwa bakteri strain dengan urutan 16s rRNA yang sama dengan *Microcococcus* memiliki kemampuan penghambatan yang baik terhadap patogen tanaman penyebab empedu mahkota yang disebabkan oleh *Agrobacterium tumefaciens* dan *Agrobacterium vitis*. Prakash *et al.*, (2014) melaporkan bakteri endofit dari genus *Microoccus* dapat merangsang pertumbuhan tanaman inangnya.

Isolat S.P3.LM.NK 6 memiliki kemiripan dengan *Kocuria palustris* dengan *query cover* sebesar 99 %, *percentage of identity* sebesar 99,42%, *max score* sebesar 2540, dan *E-value* 0,0. *Kocuria palustris* adalah spesies bakteri yang termasuk dalam genus *Kocuria*. Bakteri ini biasanya ditemukan di lingkungan yang lembab, seperti rawa atau tanah yang lembab, yang merupakan habitat alami bagi bakteri ini. *Kocuria palustris* memiliki bentuk bulat dan merupakan bakteri Gram Positif. Genus *Kocuria* pada beberapa penelitian telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber seperti tanah pertanian, tanah terkontaminasi, sedimen laut, air tawar, limbah, sampel klinis, rizosfer dan endosfer tumbuhan (Vital *et al.*, 2019). *Kocuria palustris* termasuk dalam kelompok *actinomycetes* langka yang berpotensi memiliki sumber metabolit aktif yang belum banyak diteliti struktur dan sifat aktivitasnya, banyak ditemukan di laut dan tersebar luas di spons, hanya ada sedikit informasi mengenai produk alami senyawa bioaktif, terutama dari genus *Kocuria* (Setiawan *et al.*, 2022).

2. Analisis kekerabatan berdasarkan pohon filogenetik

Hasil ini berdasarkan pohon filogenetik disajikan pada Gambar 4.7. dan diketahui bahwa bahwa isolat S.P3.LM.K 4 membentuk garis kekerabatan filogenetik dengan *Micrococcus aloe verae*, sedangkan isolat S.P3.LM.NK 6 memiliki kekerabatan dengan *Kocuria palustris*. Hasil analisis filogenetik ini sesuai dengan penelitian Ihsan *et al.*, (2020) dengan metode *neighbor-joining* dengan *Bootstrap* 1000 ulangan dalam software *Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA)*.



Gambar 4.9 Pohon filogenetik isolat bakteri isolat S.P3.LM.K 4 dan S.P3.LM.NK 6 berdasarkan gen 16S rRNA pendekatan *neighbour-joining method*, *bootstrap* 1000 ulangan

Menurut Wangiyana (2016) metode *Neighbor Joining* merupakan sebuah algoritme filogenetik yang memanfaatkan distance matrix. Berdasarkan pohon filogenetik (Gambar 4.9) tersebut isolat S.P3.LM.K 4

menunjukkan membentuk garis kekerabatan filogenetik yang dekat dengan *Micrococcus aloeverae* ditunjukkan oleh nilai kekerabatan tersebut mencapai 87%, sedangkan isolat S.P3.LM.NK 6 memiliki nilai kekerabatan mencapai 93% dengan *Kocuria palustris*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu:

1. Bakteri endofit batang kemenyan (*Styrax paralelloneurus*) berhasil diisolasi yang menunjukkan terdapat 23 isolat.
2. Karakteristik berdasarkan metode pewarnaan Gram diperoleh 13 isolat yang termasuk bakteri Gram positif dan 10 yang termasuk bakteri Gram negatif dengan bentuk batang (*basil*) dan bulat (*coccus*) dan berdasarkan uji potensi sebagai agen biostimulan tanaman berdasarkan uji penghasil hormon IAA diperoleh hasil seluruh isolat positif menghasilkan hormon IAA, sedangkan berdasarkan uji fosfat diperoleh 12 isolat yang melarutkan fosfat.
3. Hasil identifikasi dengan menggunakan analisis sekuensing gen 16S rRNA isolat S.P3.LM.K 4 memiliki kemiripan dengan *Micrococcus aloeverae* dan Isolat S.P3.LM.NK 6 memiliki kemiripan dengan *Kocuria palustris*

B. Saran

Bakteri endofit dari batang kemenyan yang teridentifikasi dan mempunyai potensi, perlu dikembangkan untuk dijadikan sebagai dalam penggunaan biofertilizer berbasis bakteri endofit dalam mengolah pertanian/perkebunan melalui aplikasi pada jenis tanaman kehutanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aji, O. R., dan Lestari, I. D. (2020). Bakteri Endofit Tanaman Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Penghasil Asam Indol Asetat (AIA). *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 13(2), 179-191.
- Anwar, L., & Futra, D. 2019. Potensi Metabolit Sekunder Produksi Bakteri Endofit dari Tumbuhan Laban (*Vitex pubescens Vahl*) sebagai antikanker). *Chempublish Journal*, 4 (2): 71-80
- Arifiani, R. N., dan Lisdiana, L. (2021). Potensi Isolat Bakteri Endofit pada Akar Tanaman Jagung (*Zea mays*) Sebagai Penghasil Hormon *Indole Acetic Acid*. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 10(3), 285-291.
- Asghari, S., Harighi, B., Mozafari, A. A., Esmaeel, Q., & Ait Barka, E. (2019). Screening of endophytic bacteria isolated from domesticated and wild growing grapevines as potential biological control agents against crown gall disease. *Biocontrol*, 64, 723-735.
- Asril, M., dan Lisafitri, Y. 2020. Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat Genus *Pseudomonas* dari Tanah Masam Bekas Areal Perkebunan Karet di Kawasan Institut Teknologi Sumatera. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 21 (1), 040-048.
- Basri. A. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). Skripsi Uin Alauddin Makassar Fakultas Sains dan Teknologi. Uin Alauddin Makassar: Makassar.
- Damanik, D. R. (2021). *Isolasi Fungi Endofit Kemenyan Toba (Styrax sumatrana) Asal Kawasan Hutan dengan Tujuan Khusus (KHDTK) Aek*

- Nauli Kabupaten Simalungun* (Doctoral dissertation, Universitas Sumatera Utara).
- Darwis, W., Supriyanto, A. P., Wibowo, R. H., Sipriyadi, S., & Supriati, R. (2022). Endophytic Bacteria Identification of Red Ginger (*Zingiber Officinale* Var. *Rubrum*) From Enggano Island. *Elkawnie: Journal of Islamic Science and Technology*, 8(1), 119-136.
- Fadhilah, N. F., Hasanah, U., dan Idramsa. (2015). Karakterisasi bakteri endofit pelarut fosfat dari kulit batang tumbuhan raru (*Cotylelobium melanoxyton*). *Jurnal Biosains*, 1(1), 31-38.
- Fajri, M. A., Agustien, A., dan Periadn adi, P. (2015). Isolasi, Karakterisasi dan Potensi Bakteri Endofitik dari Tanaman Zodia (*Evodia suaveolens Scheff*) sebagai Penghasil Antibiotika. *Jurnal Biologi UNAND*, 4(2).
- Harahap, M.I.M., (2019). Pengalaman Masyarakat PakPak Bharat Merawat Luka Menggunakan Kemenyan. *Jurnal Maternitas Kebidanan*, 4(2) 66-72
- Herlina, L., Pukan, K. K., dan Mustikaningtyas, D. (2016). Kajian bakteri endofit penghasil IAA (*Indole Acetic Acid*) untuk pertumbuhan tanaman. *J. FMIPA, UNS*, 14(1), 51-58.
- Herman, M., dan Pranowo, D. (2013). Pengaruh mikroba pelarut fosfat terhadap pertumbuhan dan serapan hara P benih kakao (*Theobroma cacao L.*). *Buletin Listri*, 4 (2): 129-138
- Hutapea, F. J., Pratiara.L dan Ahmad D.S. (2022). Improvement in trading systems and management regulations to optimize the contributions of kemenyan to government revenues and farmers. *Inovasi*, 19 (2), 99-106.

- Ihsan, Y. N., Fellatami, K., Permana, R., Mulyani, Y., & Pribadi, T. D. K. (2020). Analisis Bakteri Pereduksi Konsentrasi Logam Timbal Pb (CH₃COO) 2 Menggunakan Gen 16S rRNA. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 13(2), 151-162.
- Iswanto, A.H., Tambunan, J., Susilowati, A., Hartono, R., & Darwis, A. 2021. The resistance of *Styrax sumatrana* wood of varying growth sites and stem positions to subterranean termite (*Coptotermes curvignathus*) attack. *Biodiversitas*, 22 (6) 3192- 3198.
- Ji, S. H., Gururani, M. A., dan Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological research*, 169(1), 83-98.
- Khaerunnisa, R., Kurniati, I., Nurhayati, D., & Dermawan, A. (2019). Pemanfaatan air rebusan umbi kuning dan ungu sebagai media alternatif pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 11(1), 269-276.
- Khan, H., Akbar, W. A., Shah, Z., Rahim, H. U., Taj, A., dan Alatalo, J. M. (2022). Coupling phosphate-solubilizing bacteria (PSB) with inorganic phosphorus fertilizer improves mungbean (*Vigna radiata*) phosphorus acquisition, nitrogen fixation, and yield in alkaline-calcareous soil. *Heliyon*, 8(3).
- Kusmana, C., dan Hikmat, A. (2015). Keanekaragaman hayati flora di Indonesia. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan Journal of Natural Resources and Environmental Management*, 5(2), 187-187.

- Larasati, E. D., Rukmi, M. I., Kusdiyantini, E., dan Ginting, R. C. B. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri pelarut fosfat dari tanah gambut. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 20(1), 1-8.
- Lestari, D. E, Kartika.M dan Rizki A.M.. (2023). Potensi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Bangun-bangun (*Couleur amboinicus Lour*) sebagai Pelarut Fosfat. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 12 (3), 423-429.
- Lestari.E.2023. *Identifikasi Spesies Ikan Bebidis (Brevibora cheeya) Asal Sungai Lenggang, Belitung Timur dengan Teknik DNA Barcoding Menggunakan Gen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I)*. Skripsi thesis Universitas Bangka Belitung.Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi. Universitas Bangka Belitung: Bangka Belitung
- Mardyansyah, D dan Guntur, T. (2021).Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Potensi Bakteri Pelarut Fosfat dari Rhizosfer Tanaman Jati dan Sengon di Pegunungan Kapur, Daerah Selatan Kabupaten Tulungagung. *LenteraBio*, 10 (02): 188-198.
- Mudjiyanto, B. (2018). Tipe penelitian eksploratif komunikasi. *Jurnal studi komunikasi dan media*, 22(1), 65-74.
- Muthmainnah, B. (2019). Skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etanol buah delima (*Punica granatum L.*) dengan metode uji warna. *Media Farmasi*, 13(2), 36-41.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1-6.

- Nurwahyuni, I., Nababan, B., Pangoloi, S. dan Situmorang, M., (2022). Cinnamic Acid in Frankincense Sap as a Criterion for Propagation of *Styrax benzoin* (Sumatera Benzoin) in Sumatera Indonesia. *International Journal of Forestry Research*.
- Pasaribu, G., Jasni, J., Damayanti, R., dan Wibowo, S. (2013). Sifat Anatomi, Sifat Fisis Dan Mekanis Pada Kayu Kemenyan Toba (*Styrax Sumatrana*) Dan Kemenyan Bulu (*Styrax Paralleloneurus*). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 31(2), 161-169.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., Munot, H., Sharma, A., Vemuluri, V. R., Chavadar, M. S., & Shouche, Y. S. (2014). Description of *Micrococcus aloeverae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aloe vera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_10), 3427-3433.
- Purwaningsih, D., & Wulandari, D. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fermentasi Bakteri Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta* L) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*: Potential of Antibacterial Compound Fermentation of Endophytic Bacteria from Taro Tuber (*Colocasia esculenta* L.) againts *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(5), 750-759.
- Puspita, F., Saputra, S. I., & Merini, J. (2018). Uji beberapa konsentrasi bakteri *Bacillus* sp. endofit untuk meningkatkan pertumbuhan bibit kakao (*Theobroma cacao* L.). *Indonesian Journal of Agronomy*, 46(3), 322-327.

- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., ... & Arai, M. (2022). Fungicide activity of culture extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of fungi*, 8(3), 280.
- Silalahi.J., Asep J., Bambang.S.A., Ahmad.D.S., Johni.A.B., Wendra.S.M., dan Hendra S. (2013). *Buku Kecil Kemenyan Getah Berharga Tano Batak*. AEK NAULI: Sumatera Utara
- Suwarni, S., dan Linda.A. (2021). Deteksi IAA Pada *Pseudomonad* Fluoresen Serta Pengaruhnya Terhadap Panjang Akar Kecambah Cabai Rawit (*Capsicum frutescens L.*).*Semna.Bio*.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2016). Phylogenetic analysis of *Aquilaria* and *Gyrinops* member based on trnL-trnF gene sequence of Chloroplast. *Jurnal Sangkareang Mataram*, 2(4), 41-46.
- Wibowo, R.H., Stella, R. S., Sipriyadi., Welly, D., Rochmah S., Thoriqul,H., dan Sal, P.Y.S.(2022). Kemampuan Bakteri Endofit Pelarut Fosfat Dari Tumbuhan Akar Kuning (*Arcangelisia flava L.*) Merr) Asal Pulau Enggano, Provinsi Bengkulu. *Jurnal Biologi*, 15(2): 171- 181.
- Widowati, T., Simarmata, R., Nuriyanah, L. N., dan Lekatompessy, S. J. (2020). Aktivitas Metabolit Sekunder Pemacu Pertumbuhan dari Bakteri Endofit Asal Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria ROSC*). *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 31(2), 97-106.
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta L.* secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2), 247-258.

Zacaria Vital, T., Román-Ponce, B., Rivera Orduña, F. N., Estrada de los Santos, P., Vásquez-Murrieta, M. S., Deng, Y., ... & Wang, E. T. (2019). An endophytic *Kocuria palustris* strain harboring multiple arsenate reductase genes. *Archives of microbiology*, 201, 1285-1293.

Zulkifli.L.,Dwi. S.D.J., Samsul.B. 2018.(Lenny Anwar & Futra, 2019) Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Kulit Batang Srikaya (*Annona Squamosa*) dan Potensinya Sebagai Anti Bakteri. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. 4 (1).