

## KARAKTERISASI DAN POTENSI BAKTERI ENDOFIT AKAR KOPI (*Coffea sp*) SEBAGAI PENGHASIL *INDOLE ACETIC ACID* (IAA)

Esti Rizkiana Pratiwi<sup>1</sup>, Elsa Mega Suryani<sup>2</sup>, Indra Adi Wira Prasetya<sup>3</sup>, Nadiyah Al Batati<sup>4</sup>

<sup>123</sup> Program Studi S1 Mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Maarif Hasyim  
Latif

<sup>4</sup> Program Studi D4 Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas  
Maarif Hasyim Latif

Email: [esti\\_rizkiana@dosen.umaha.ac.id](mailto:esti_rizkiana@dosen.umaha.ac.id), [elsamega.syn@dosen.umaha.ac.id](mailto:elsamega.syn@dosen.umaha.ac.id),  
[indra\\_adi@dosen.umaha.ac.id](mailto:indra_adi@dosen.umaha.ac.id), [nadiyah@dosen.umaha.ac.id](mailto:nadiyah@dosen.umaha.ac.id)

---

### ABSTRACT

The Endophytic bacteria as a biofertilizer agent can minimize the use of chemicals from synthetic fertilizers. The aim of this research was to study the density, diversity and ability of endophytic bacteria from coffee plants that have the potential to produce IAA. Root samples were obtained from coffee plants in UB Forest (UBF), Sumberwangi, Malang. The root samples were surface sterilized and then crushed with a blender. Endophytic bacteria were isolated and tested for their potential to produce IAA. The results obtained were 18 isolates of IAA-producing bacteria. KAA6 Isolate were produced the highest concentration of IAA of 10.73 ppm at 48 hours of incubation followed by KBA3 isolate which produced 12.78 ppm of IAA at 72 hours of incubation. Time of sampling and location of the land (coffee with shade and without shade) are factors that affect the ability of endophytic bacteria to produce IAA. The potential bacteria can be further optimized to be used as an eco-friendly biofertilizer agent.

---

### ARTICLE HISTORY

Received 6 February 2024  
Revised 16 March 2024  
Accepted 1 April 2024

---

### KEYWORDS

Coffea  
Endophytes Bacteria  
IAA

---

### Pendahuluan

Kopi (*Coffea sp*) adalah minuman paling populer dan banyak dikonsumsi. Kopi sebagai komoditas pertanian daerah tropis sangat berkembang baik di negara-negara pengimpor maupun pengeksport (Maredia, 2023). Permintaan kopi semakin meningkat setiap tahunnya berkaitan dengan kepopuleran kopi dan kesadaran atas manfaat positif yang diperoleh dengan mengkonsumsi kopi bagi kesehatan manusia. Selain itu, kopi juga masih menjadi andalan eksport bagi negara Indonesia dan sumber pendapatan devisa negara. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS, 2023), hasil produksi kopi di Indonesia pada tahun 2022 mengalami

\*CORRESPONDING AUTHOR. Email: [esti\\_rizkiana@dosen.umaha.ac.id](mailto:esti_rizkiana@dosen.umaha.ac.id)

peningkatan dibandingkan hasil produksi tahun-tahun sebelumnya. Produksi kopi di tahun 2022 adalah sebesar 794,8 ton, sedangkan pada tahun 2021 sebesar 786,2 ton. Jumlah peningkatan produksi kopi tersebut memberikan kesempatan bagi produsen kopi di Indonesia untuk lebih memperluas penjualan kopi baik untuk di dalam negeri maupun diekspor ke beberapa negara.

Sebanyak enam puluh persen (60 %) kopi secara global di produksi dari lahan pertanian. Lahan pertanian yang banyak digunakan adalah lahan Agroforestri. Lahan Agroforestry digunakan untuk mengurangi biaya produksi kopi, mendiversifikasi pendapatan, dan memenuhi kebutuhan penghidupan. Budidaya tanaman kopi umumnya dapat dilakukan di dataran tinggi seperti pegunungan. Tanaman kopi dapat di tanam langsung (tanpa naungan/kanopi) maupun di bawah naungan/kanopi pepohonan yang teduh. Sistem budidaya kopi di lahan Agroforestry seringkali ditemukan terintegrasi dengan sistem pertanian lain yaitu tanaman lain yang ditanam bersamaan dengan komoditas pertanian kopi. Metode tradisional yang masih dilakukan oleh petani kopi adalah masih penggunaan pestisida dan pupuk sintetis untuk menyelesaikan permasalahan dalam budidaya tanaman kopi namun penggunaannya dapat merugikan bagi mikroba dan menyebabkan pencemaran tanah ( Narango et al., 2019; Siles et al., 2022; Asad et al., 2023; Purba et al., 2023).

Pertumbuhan tanaman kopi sangat bergantung pada kualitas benih dan pemupukan. Pemanfaatan bakteri endofit adalah salah satu inovasi terbaru dalam bidang pertanian organik. Bakteri endofit adalah bakteri yang berasosiasi dan berkolonisasi jaringan antar sel (intraseluler). Sebagian besar bakteri endofit diketahui bersifat sebagai simbiosis yang memberikan banyak manfaat bagi tanaman. Keberadaan bakteri endofit dapat dijadikan sebagai kandidat potensial untuk pengembangan pupuk hayati. Beberapa mikroba endofit dapat ditemukan berasosiasi dengan tanaman kopi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit pada tanaman kopi dapat memberi manfaat dalam mendukung dan meningkatkan pertumbuhan tanaman kopi. Penggunaan bakteri endofit pada bidang pertanian mempunyai potensi dan peluang besar dalam mengurangi dampak negatif di lingkungan akibat penggunaan pupuk sintetis. Tren global jangka Panjang menunjukkan bahwa peningkatan permintaan terhadap produk pangan dan pertanian. Oleh karena itu, dibutuhkan pertanian yang berkelanjutan supaya dapat memenuhi kebutuhan dan melestarikan sumber daya alam. Upaya yang terus dilakukan adalah dengan meminimalkan penggunaan pupuk hayati yang mendukung pertanian berkelanjutan (Duguma et al., 2019; Siles et al., 2022; Adeleke et al., 2021; Asad et al., 2023; Purba et al., 2023;)

Bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan IAA (*Indole acetic acid*) yaitu fitohormon yang dapat mempercepat pertumbuhan tanaman (Purba et al., 2023). Penelitian (Pratiwi et al., 2020) memperoleh *Bacillus cereus* ATCC 14579, yaitu bakteri endofit dari akar tanaman kopi Robusta dan Kopi Arabika yang memiliki potensi penghasil hormon IAA (*indole acetic acid*) untuk memicu pertumbuhan tanaman kopi. Penelitian (Purba et al., 2023) juga berhasil mendapatkan bakteri endofit yang diisolasi dari akar dan batang kopi dengan kemampuan menghasilkan hormon IAA. Hal ini menunjukkan bahwa endofit kopi berpotensi besar menjadi alternatif pupuk hayati yang dapat diaplikasikan sebagai biofertilizer.

UB Forest (UBF) adalah lahan hutan yang didominasi oleh pohon pinus, sengon, mahoni dan beberapa komoditas pertanian seperti kopi dan tanaman obat (Bunga Hutamy & Nuraini, 2019). Budidaya tanaman kopi yang ditanam di area lahan UBF ada yang tertutup oleh naungan (kanopi) pohon pinus dan ada yang tidak tertutup naungan (tidak ada kanopi). Belum banyak informasi terkait bakteri endofit dari akar kopi yang ditanam di bawah naungan dan tanpa naungan. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari densitas, diversitas dan kemampuan bakteri endofit dari tanaman kopi di UBF yang di tanam di bawah

naungan pohon pinus dan tanpa naungan yang berpotensi dalam menghasilkan IAA. Bakteri yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA diharapkan dapat dijadikan sebagai agen PGP (*Plant Growth Promoting*) untuk membantu dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman kopi dan meningkatkan kesuburan tanah sehingga dapat dijadikan sebagai aplikasi produk untuk pengembangan biofertilizer yang mampu membantu dalam menjaga produktivitas tanaman kopi.

## **Metode**

### **Deskripsi area dan pengambilan sampel**

Sampel akar diperoleh dari lahan perkebunan Kopi di UB Forest (UBF). UB Forest terletak di lereng Gunung Arjuna, Desa Sumberwangi, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang, Jawa Timur, Indonesia. Koordinat lokasi pengambilan sampel adalah 07.821705° Lintang Selatan dan 112.577551 Bujur Timur, dengan ketinggian kurang lebih 1058 m di atas permukaan laut (dpl). Pengambilan sampel akar diambil dari kedua lokasi yaitu area lahan tanaman kopi yang ternaungi dengan pohon Pinus (KA) dan lahan tanaman kopi yang tidak ternaungi (KB). Masing-masing lahan, akar tanaman kopi diambil secara acak dengan hasil komposit akar dari tiga tanaman yang dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Diperoleh total 6 sampel untuk kedua area lahan kopi. Sampel akar setiap tanaman merupakan akar-akar sekunder dengan bagian ujung yang masih sehat yang diambil pada kedalaman sekitar 10 cm. Sampel akar ditempatkan dalam kantong plastik dan disimpan dalam kotak isothermal/*cool box* untuk dianalisis di laboratorium. Parameter lingkungan di lokasi pengambilan sampel juga diukur sebagai faktor lingkungan di lokasi pengambilan sampel.

### **Isolasi bakteri endofit penghasil IAA**

Sampel akar dibersihkan dengan air mengalir dan akuades steril, kemudian dipotong kecil-kecil  $\pm$  2-3 cm. Akar kemudian diberi perlakuan sterilisasi permukaan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk proses isolasi bakteri. Metode sterilisasi permukaan sampel akar mengikuti metode dari (Pratiwi et al., 2020). Sampel akar yang sudah disterilkan dikonfirmasi dengan cara menginokulasikan 0,1 mL akuades terakhir sisa pencucian akar pada media *nutrient agar* (NA). Jika tidak ada bakteri yang tumbuh, maka proses sterilisasi akar sudah baik dan benar. Sampel akar steril sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam 90 mL larutan 0,85 % NaCl (garam fisiologis), kemudian sampel dihaluskan dengan cara digiling menggunakan blender hingga homogen. Suspensi sampel akar yang sudah halus selanjutnya diproses untuk isolasi bakteri melalui metode serial dilusi. Isolasi bakteri endofit penghasil IAA mengacu metode (Pratiwi et al., 2020). Kultur diinkubasi pada suhu 28 °C selama 48 jam untuk memperoleh bakteri endofit penghasil hormon IAA.

Koloni yang tumbuh dari setiap pengenceran dihitung dengan TPC (*Total Plate Count*) untuk dibandingkan jumlah kelimpahan koloni bakteri. Kelimpahan isolat yang mendominasi pada setiap lokasi dilakukan dengan menentukan diversitas komunitas bakteri. Koloni tunggal yang memiliki karakter berbeda dihitung berdasarkan diversitas bakterinya dengan indeks diversitas Simpson menggunakan rumus (1) (Roswell et al., 2021).

$$D = 1 - \sum_i^s \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \quad (1) \text{ (Roswell et al., 2021)}$$

Keterangan:

D = Indeks Diversitas Simpson

n = Jumlah individu jenis ke-i

N = Jumlah total individu

s = Jumlah total spesies dalam satu komunitas

Masing-masing isolat bakteri endofit penghasil IAA hasil isolasi kemudian dikarakterisasi secara makroskopis berdasarkan morfologi koloni (permukaan koloni, tekstur koloni, bentuk koloni, pinggiran / margin koloni, elevasi koloni, ciri optik, dan pigmentasi / warna koloni). Karakterisasi secara mikroskopis diamati melalui pewarnaan Gram (*Gram staining*) dan bentuk bakteri di bawah mikroskop. Isolat koloni tunggal kemudian dimurnikan secara *spread plate*.

## Potensi bakteri endofit penghasil hormon IAA

### 1. Uji Kualitatif dengan kolorimetri menggunakan membran nitroselulosa

Isolat bakteri yang sudah dimurnikan selanjutnya akan diuji secara kualitatif dalam kemampuannya sebagai penghasil hormon IAA menggunakan membran nitroselulosa. Masing-masing isolat disetarakan umur biakan dan densitasnya terlebih dahulu. Kultur bakteri dengan umur dan densitas yang sama kemudian ditumbuhkan dalam 25 mL media cair *Triptic Soy Broth* (TSB) yang ditambahkan dengan *L-Tryptophan* sebanyak 1 µg/mL. Kultur diinkubasi pada suhu 28 ° C selama 72 jam. Kultur kemudian diambil sebanyak 0,1 mL lalu di *spread plate* pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA). Cawan petri yang telah diinokulasi bakteri tersebut kemudian dilapisi dengan membran nitroselulosa. Inkubasi dilakukan pada suhu 28 ° C selama 72 jam di dalam ruang gelap. Setelah diinkubasi di dalam ruang gelap, membran nitroselulosa diambil dan diletakkan pada cawan petri steril lalu digenangi oleh reagen Salkowski, diinkubasi selama 30 menit pada ruang gelap. Membran yang memberikan perubahan warna menjadi merah atau merah muda (*pink*) menunjukkan indikasi adanya hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri endofit. Perubahan warna pada membran nitroselulosa selanjutnya akan diamati menggunakan sistem skor (penilaian) menurut (Suharjono & Yuliatin, 2022). Sistem skor (penilaian) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sistem skor (penilaian) perubahan warna IAA

Warna	Skor
Merah pekat	4
Merah	3
Merah muda gelap	2
Merah muda	1

### 2. Uji Kuantitatif dengan kolorimetri menggunakan reagen Salkowski

Isolat bakteri terpilih yang terdeteksi dapat menghasilkan hormon IAA melalui uji kualitatif, selanjutnya akan diuji secara kuantitatif menggunakan reagen Salkowski mengacu metode (Pratiwi et al., 2020). Starter bakteri dibuat dengan menginokulasikan isolat bakteri

dalam 25 mL media TSB dengan penambahan 2 % *L-Tryptophan* (1µg/mL). Kultur starter disetarakan ( $\lambda = 550$  nm) kemudian sebanyak 10 % kultur bakteri diinokulasikan ke dalam 45 mL media TSB baru (steril) yang sudah diberi penambahan 2 % *L-Tryptophan* (1µg/mL). Kontrol pembandingan untuk uji IAA adalah berupa media TSB steril tanpa inokulum. Selanjutnya, inkubasi dilakukan selama 72 jam pada suhu 28 °C.

Pengukuran kuantitatif konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri terpilih dilakukan pada waktu inkubasi 0, 24, 48, dan 72 jam. Konsentrasi IAA diukur dengan cara mengambil 3 mL suspensi bakteri dan disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet dibuang, supernatan diambil sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan reagen Salkowski sebanyak 4 mL. Inkubasi dilakukan selama satu jam pada ruang gelap. Selanjutnya, suspensi dengan intensitas warna yang berbeda diukur dengan spektrofotometer ( $\lambda = 535$  nm). Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh masing-masing isolat terpilih dihitung dari persamaan kurva standar IAA dengan mengkorelasikan variasi konsentrasi dengan absorbansi pada Panjang gelombang 535 nm. Kurva standar IAA dibuat dari serial konsentrasi IAA sintetis. Adapun perbandingan kurva standar IAA sintetis yang digunakan disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan kurva standar IAA sintetis

Konsentrasi (µM)	IAA Sintetis (mL)	MediaTS B (mL)	Reagen Salkowski (mL)
0	0	2	4
2	0.16	1.84	4
4	0.32	1.68	4
6	0.48	1.52	4
8	0.64	1.36	4
10	0.8	1.2	4
12	0.96	1.04	4
14	1.12	0.88	4
16	1.28	0.72	4
18	1.44	0.56	4
20	1.6	0.4	4

## Analisis Data

Data parameter lingkungan yang diperoleh dalam penelitian dianalisis dengan uji T-Test (SPSS V.20). Data karakteristik isolat bakteri dianalisis untuk mengidentifikasi persamaan atau kemiripan antar kelompok isolat menggunakan *clustering* (PAST4.03). Data produksi hormon IAA oleh bakteri dianalisis dengan *Two way ANOVA*, Univariate dengan  $\alpha \leq 0,05$ . Hasil yang berbeda nyata dilakukan uji lanjutan menggunakan *Tukey* untuk mendapatkan hasil evaluasi perbedaan kemampuan masing-masing isolat bakteri endofit dalam menghasilkan hormon IAA.

## Hasil

### Karakteristik Faktor Lingkungan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada pengukuran faktor-faktor lingkungan (Tabel 3), parameter pH tanah, kadar air, dan diameter pohon pada lokasi tanaman kopi dengan naungan pohon pinus (KA) maupun tanpa naungan (KB) menunjukkan hasil yang tidak signifikan. Hal

ini menandakan bahwa pada ketiga parameter tersebut, nilai pH tanah, kadar air dan diameter pohon tidak berbeda nyata antara kedua lokasi. Parameter suhu tanah dan bahan organik tanah menunjukkan hasil yang signifikan sehingga nilai dari kedua parameter tersebut adalah berbeda nyata di kedua lokasi. Suhu tanah yang rendah serta kadar air tanah yang cukup pada lokasi KA dan KB yaitu masing-masing 20,5 °C dan 22,3 °C serta 79,7 % dan 74,9%. Bahan organik tanah yang diperoleh yaitu 8,2 % pada lokasi KA dan 14,9 % pada lokasi KB. Hal ini berkaitan dengan pH tanah yang terukur tergolong asam di kedua lokasi (Tabel 3).

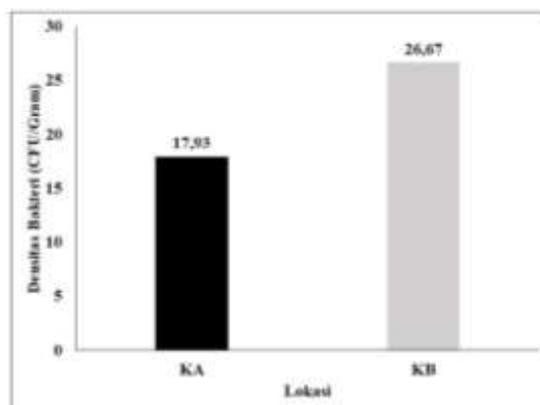
Tabel 3. Faktor lingkungan kedua lokasi tanaman kopi

Parameter Lingkungan	Lokasi	
	Kopi dengan naungan (KA)	Kopi tanpa naungan (KB)
pH tanah	4.93 ± 0,56 a	4.94 ± 0,44 a
Suhu Tanah (°C)	20.5 ± 1,02 a	22.3 ± 1,92 b
Kadar Air Tanah (%)	79.7 ± 3,42 a	74.9 ± 4,64 a
Bahan organik tanah (%)	8.2 ± 9,93 b	14.9 ± 0,59 a
Diameter pohon (cm)	5.75 ± 0,95 a	7.6 ± 0,48 a

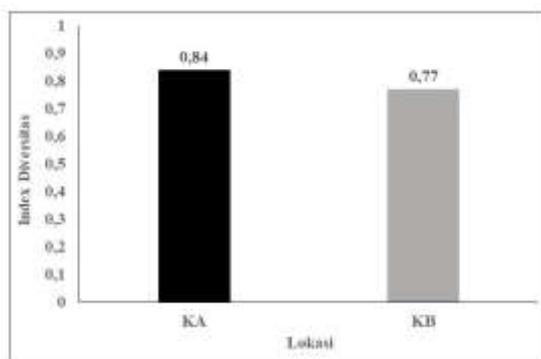
\*Keterangan: Baris huruf yang berbeda untuk setiap parameter menunjukkan nilai signifikan ( $p > 0,05$ ) dengan menggunakan uji *T-Test* antara dua sampel tanah dari jenis tanaman kopi dan naungan yang berbeda

### Densitas dan Diversitas bakteri endofit penghasil hormon IA

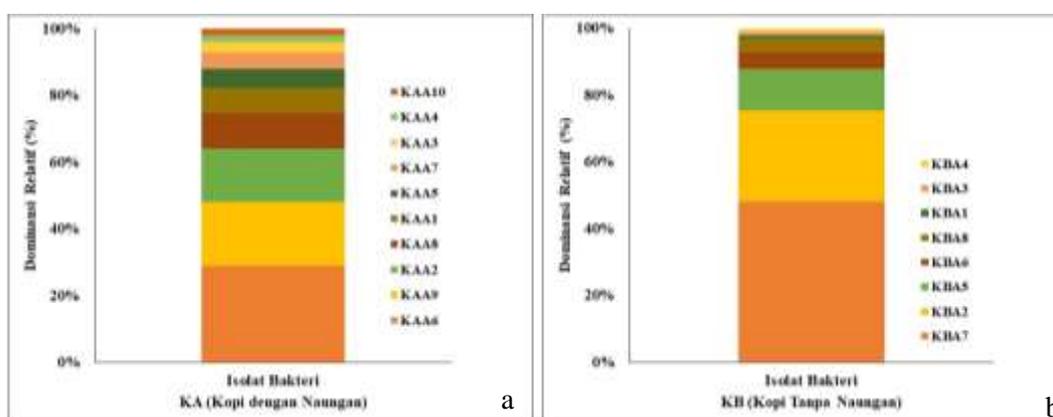
Densitas sel bakteri endofit akar kopi penghasil IAA pada lokasi KA adalah  $17,93 \times 10^3$  CFU/gram lebih sedikit dibandingkan pada lokasi KB yaitu  $26,67 \times 10^3$  CFU/gram (Gambar 1). Indeks diversitas bakteri endofit akar kopi pada kedua lokasi tergolong cukup tinggi yaitu antara 0,77- 0,84. Artinya, terdapat dominasi dari satu atau beberapa spesies bakteri pada kedua lokasi karena nilai indeks semakin mendekati angka 1. Indeks diversitas bakteri endofit akar Kopi di lokasi KA lebih tinggi dibandingkan dengan lokasi KB yaitu masing-masing 0,84 dan 0,77 (Gambar 2). Lokasi KA memperoleh sebanyak 10 isolat, berbeda dengan lokasi KB memperoleh sebanyak 8 isolat. Berdasarkan analisis diversitas (Gambar 3), persentase dominansi relative dari isolate bakteri endofit akar kopi menandakan bahwa pada lokasi KB terdapat isolat yang mendominasi >50 % yaitu isolat KBA7 dengan persentase 48,1 %.



Gambar 1. Nilai densitas bakteri endofit akar kopi penghasil IAA (KA = Lokasi lahan tanaman kopi dengan naungan, KB = Lokasi lahan Tanaman Kopi tanpa naungan)



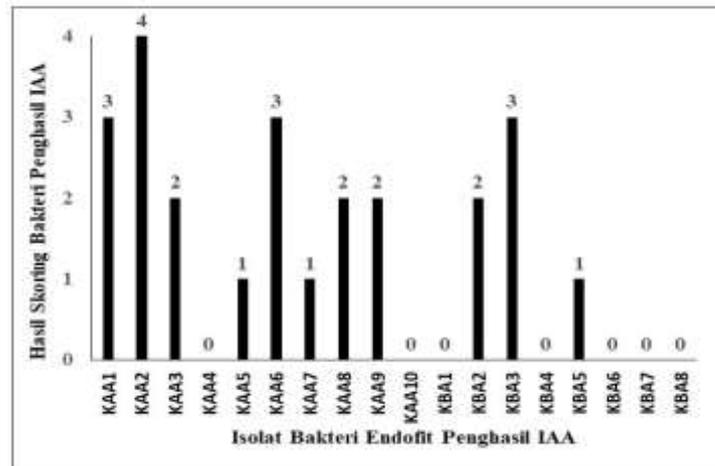
Gambar 2. Nilai indeks diversitas bakteri endofir akar kopi penghasil IAA (KA = Lokasi lahan tanaman kopi dengan naungan, KB = Lokasi lahan Tanaman Kopi tanpa naungan)



Gambar 3. Presentase dominansi relatif dari isolate bakteri endofit akar kopi  
 a. Presentase isolat bakteri endofit dari tanaman kopi dengan naungan (KA)  
 b. Presentase isolate bakteri endofit dari tanaman kopi tanpa naungan (KB)

### Potensi bakteri endofit akar kopi sebagai penghasil hormon IAA

Kemampuan isolat bakteri endofit akar kopi menghasilkan IAA berdasarkan perubahan warna (Uji kualitatif) diuji pada masing-masing 10 isolat bakteri dari lokasi dengan naungan (KA) dan 8 isolat bakteri dari lokasi tanpa naungan (KB). Gambar 4 menunjukkan hasil perbandingan skoring isolat bakteri penghasil hormon IAA pada akar kopi dari kedua lokasi. Sebanyak 18 total isolat yang diuji menggunakan membran nitroselulosa, hanya 11 isolat yang memenuhi warna sesuai kriteria yaitu merah pekat, merah, merah muda gelap, dan merah muda (Gambar 5). Sebelas isolat yang menunjukkan perubahan warna yaitu 8 isolat dari lokasi KA yaitu isolat KAA1, KAA2, KAA3, KAA5, KAA6, KAA7, KAA8, KAA9 dan 3 isolat lainnya dari lokasi KB yaitu KBA3, KBA2 dan KBA5. Isolat dengan nilai skor tertinggi adalah isolat KAA2 dari lokasi KA (kopi dengan naungan).

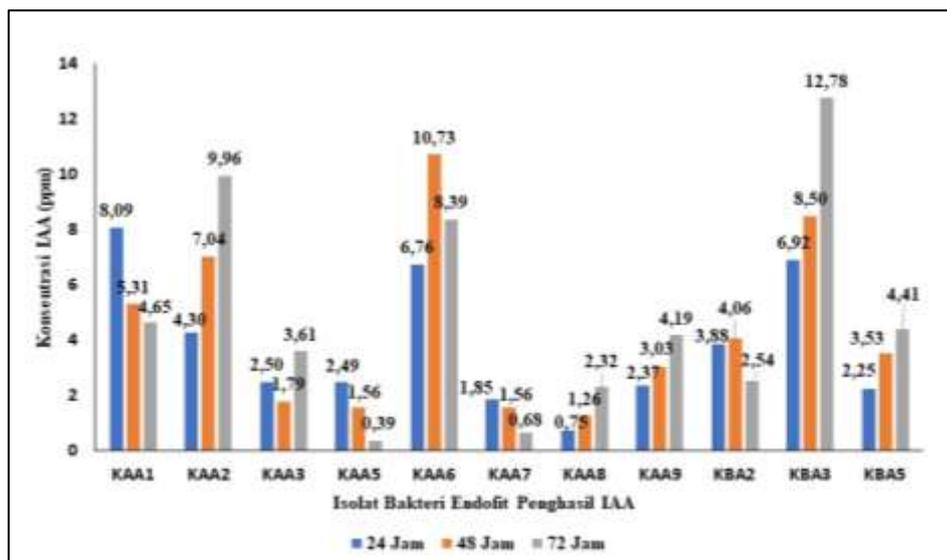


Gambar 4. Skoring Bakteri endofit akar kopi penghasil IAA dari lokasi dengan naungan (KA) dan lokasi tanpa naungan (KB)



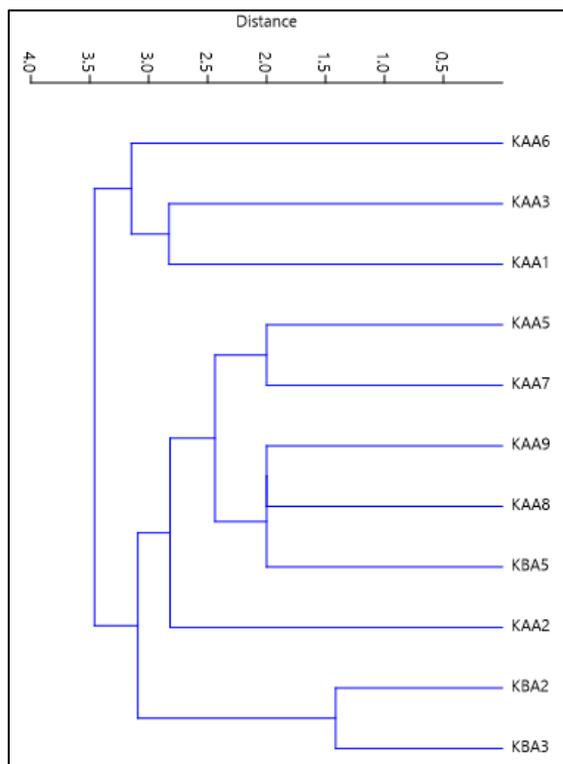
Gambar 5. Perubahan warna sebagai indikator adanya produksi IAA oleh bakteri endofit. Skor 0 (a-d), Skor 1 (e), Skor 2 (f), Skor 3 (g), dan Skor 4 (h)

Kesebelas isolat terpilih dari uji kualitatif kemudian dilakukan uji kuantitatif menggunakan reagen Salkowski untuk mengetahui jumlah konsentrasi IAA yang dihasilkan. Hasil kuantitatif produksi IAA masing-masing isolat ditunjukkan pada Gambar 6. Hasil menunjukkan adanya variasi bakteri endofit dalam menghasilkan IAA. Konsentrasi IAA tertinggi diperoleh dari isolat KAA6 (10,73 ppm) pada inkubasi 48 jam yang merupakan isolat dari lokasi KA yaitu tanaman kopi dengan naungan dan isolat KBA3 (12,78 ppm) pada inkubasi 72 jam yang merupakan isolat dari lokasi KB yaitu tanaman kopi tanpa naungan.



Gambar 6. Konsentrasi IAA yang dihasilkan Bakteri endofit akar kopi dari kedua lokasi berdasarkan lama waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam.

Karakterisasi dari 11 isolat terpilih dan potensial dalam menghasilkan IAA selanjutnya dianalisis secara makroskopis dan mikroskopis (Tabel 4). Analisis Klustering isolat penghasil IAA dilakukan menggunakan program PAST, sehingga diketahui kesamaan (kemiripan) karakter yang dimiliki oleh masing-masing isolat. Hasil klasterisasi (Gambar 7) diperoleh bahwa pada jarak 0,5 isolat-isolat potensial penghasil IAA masuk ke dalam 7 kelompok. Isolat KBA2 dan KBA3 berada dalam satu kelompok dengan persentase kemiripan 95%. Persentase kemiripan antara isolat KBA2 dan KBA3 adalah 90 % dengan perbedaan terletak pada karakter margin (tepi koloni). Sementara itu, pada persentase kemiripan 53% diperoleh dari kelompok isolat KAA5 dan KAA7. Perbedaan karakter diantara keduanya terletak pada pigmentasi (warna koloni) dan pewarnaan Gram, dimana isolat KAA5 adalah Gram positif, sedangkan KAA7 adalah Gram negatif. Klasterisasi karakter bakteri dapat digunakan sebagai acuan untuk identifikasi awal. Identifikasi lanjutan dapat dilakukan menggunakan analisis sekuen DNA bakteri dengan gen 16S rDNA sehingga dapat diketahui spesies bakterinya.



Gambar 7. Analisis Klustering berdasarkan kemiripan karakter isolat bakteri endofit akar kopi penghasil IAA

Tabel 4. Karakterisasi makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri endofit

Parameter	Isolat bakteri endofit terpilih										
	KAA 1	KAA 2	KAA 3	KAA 5	KAA 6	KAA 7	KAA 8	KAA 9	KBA 2	KBA 3	KBA 5
<b>Bentuk koloni</b>											
Bulat	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Irregular	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Berserabut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berfilamen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Margin</b>											
Erose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beralun	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Lobate	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Menyeluruh	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<b>Elevasi</b>											
Umbonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cembung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pulvinat	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Datar	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Tekstur koloni</b>											
Berkontur	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kasar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Licin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Konsistensi permukaan</b>											
Kering	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lekit	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+

Parameter	Isolat bakteri endofit terpilih										
	KAA 1	KAA 2	KAA 3	KAA 5	KAA 6	KAA 7	KAA 8	KAA 9	KBA 2	KBA 3	KBA 5
Licin	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Tipis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ciri Optik</b>											
Opalesens	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Pudar	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Berkilat	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>Pigmentasi (warna koloni)</b>											
Putih pudar	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Putih	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putih Susu	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Kuning	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Tidak berwarna	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Kuning pudar	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Pewarnaan Gram</b>											
Positif	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Negatif	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<b>Bentuk Bakteri</b>											
Basil	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Coccus	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

## Diskusi

Banyak nya jumlah mikroorganisme yang diperoleh berkaitan dengan kandungan bahan organik tanah karena tingginya bahan organik mampu mendorong pertumbuhan mikroorganisme (Aragão et al., 2023; de Souza et al., 2023) . Hal ini selaras dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa Densitas sel bakteri endofit akar kopi penghasil IAA pada lokasi KB (tanpa naungan) lebih tinggi yaitu  $26,67 \times 10^3$  CFU/gram diikuti dengan kadar bahan organik di lokasi tersebut yang juga tinggi dibandingkan dengan lokasi KA (dengan naungan) dengan perbedaan yang nyata. Indeks Diversitas Simpson mempertimbangkan pemerataan spesies, memperhitungkan jumlah spesies serta kelimpahan setiap spesies. Nilai indeks yang mendekati 1 menandakan bahwa nilai diversitas nya tinggi (komunitas bakteri yang ada di dalam sampel beragam) (Roswell et al., 2021). Diketahui bahwa Indeks diversitas bakteri endofit akar Kopi di lokasi KA dan lokasi KB mendekati nilai 1 dengan lokasi KA lebih tinggi dibandingkan dengan lokasi KB. Hal ini menunjukkan komunitas bakteri dari kedua lokasi adalah beragam.

Keberadaan komunitas bakteri endofit yang terdapat di dalam jaringan tanaman merupakan komunitas yang bermanfaat bagi tanaman (inangnya). Bakteri endofit berkolonisasi dengan tanaman, diketahui mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman. Bakteri endofit juga mampu meningkatkan jumlah nutrisi yang dikonsumsi tanaman dan mempengaruhi fitohormon yang dikeluarkan. Fitohormon yang dikeluarkan oleh tanaman bertanggung jawab dalam meningkatkan pertumbuhan dan mengatasi stress lingkungan. Sehingga, bakteri endofit yang memiliki kemampuan menghasilkan hormon seperti IAA (*Indole acetic acid*) adalah bakteri yang dapat mendukung tanaman dalam proses pertumbuhan. Hal ini karena hormon IAA termasuk dalam fitohormon yang mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman. (Ali et al., 2021).

Diversitas bakteri endofit pada tanaman sangat bervariasi dan bergantung pada faktor lingkungan. Faktor yang mempengaruhi diversitas dan keanekaragaman bakteri endofit seperti: genotip tanaman inang, umur tanaman, jenis tanaman, Teknik pertanian, suhu, kelembaban, perubahan iklim, bahan organik dan berbagai jenis ketersediaan nutrisi untuk tanaman. Faktor-faktor tersebut adalah faktor yang dapat membantu dan mendukung dalam meningkatkan diversitas dan keanekaragaman bakteri endofit dengan genus yang beragam. Berbagai kultivar atau variasi dari tanaman akan mempengaruhi tipe komunitas bakteri endofit yang ditemukan. Sifat fisikokimia tanah dan lokasi tempat tanaman ditumbuhkan juga berpengaruh pada komposisi bakteri endofit menjadi berbeda dan beragam. Artinya, meskipun spesies tanaman memiliki genotip yang sama, namun apabila di tanam di jenis tanah yang berbeda, lokasi yang berbeda dan Teknik atau praktik pertanian yang berbeda maka hal ini memberikan pengaruh pada diversitas dan keragaman bakteri endofit yang ditemukan (Khaskheli et al., 2020; (Ali et al., 2021).

Spesies tanaman inang dan jenis tanah adalah penentu paling penting dalam menyeleksi komunitas bakteri endofit yang ada di dalamnya, kemudian diikuti dengan tanggal pengambilan sampel dan lokasi pengambilan sampel. Berbagai varietas tanaman dari suatu spesies tanaman yang di tanam pada tanah yang sama juga akan memperoleh diversitas dan keanekaragaman bakteri endofit yang berbeda-beda. Sehingga, spesies tanaman sangat menentukan jenis bakteri endofit. Varietas tanaman yang sama namun di tanam pada jenis tanah yang berbeda, maka bakteri endofit yang diperoleh juga berbeda-beda. Selain itu, faktor adanya fitopatogen pada tanaman inang juga menjadi penentu keberadaan bakteri endofit di dalamnya. Komunitas bakteri endofit merupakan suatu proses dinamis yang erat dikendalikan oleh tanaman inang, dimana bakteri endofit yang berada di tanaman inang pada situasi tertentu adalah bakteri yang memang disukai oleh tanaman dibandingkan bakteri endofit lainnya (Afzal et al., 2019; Ali et al., 2021; Khaskheli et al., 2020).

Sistem pertanian kopi dengan cara menanam kopi di tempat teduh (dengan naungan) diketahui dapat melestarikan keanekaragaman hayati termasuk keberadaan bakteri. Sistem pertanian kopi organik merupakan sistem pertanian yang mendukung konservasi keanekaragaman hayati. Sehingga, disimpulkan bahwa kopi yang ditanam di tempat teduh menggunakan sistem pertanian organik sangat relevan dengan sistem pangan yang berkelanjutan. Sistem pertanian agroforestri banyak diterapkan pada wilayah daerah tropis dengan ditandai banyaknya spesies tanaman pohon yang berbeda, termasuk pertanian kopi. Sistem pertanian agroforestry kopi Robusta dan kopi Arabika banyak ditemukan di wilayah Afrika, Amerika, dan Asia. Kopi yang ditanam di Kawasan agroforestri bersamaan dengan jenis tanaman yang tinggi (Pohon). Sistem agroforestry adalah sistem pertanian yang menarik dan menjadi pilihan yang efektif untuk mengurangi hilangnya hutan, untuk melestarikan keanekaragaman hayati dan menyediakan hal-hal penting seperti sumber pendapatan bagi penduduk local (Donko et al., 2019; Jimenez-Soto, 2021).

Akar tanaman merupakan organ khusus yang memberikan dukungan mekanis tanaman dalam penyerapan unsur hara dari tanah. Pada akar terdapat jaringan penyangga (Xilem dan Floem) yang berperan dalam memperlancar penyerapan dan pergerakan unsur hara dan air langsung dari tanah ke batang dan bagian tanaman lainnya. Kemampuan bakteri endofit yang berasosiasi dengan akar dan mampu menghasilkan IAA yang dapat memperkuat akar serta perkembangannya, sehingga memberikan kontribusi terhadap nutrisi tanaman dalam menyerap unsur hara dari tanah. Seperti pada tanah, akar yang tertanam di dalam tanah menampung berbagai macam konsorsium bakteri. Sistem arsitektur akar dan aktivitas proses kimiawi (nutrisi) di dalam akar dapat memodulasi aktivitas bakteri endofit akar di daerah endo-rizosfer (di dalam akar) (Hashem et al., 2019; Wang et al., 2019; Adedeji & Babalola, 2020).

Berbagai metode dapat digunakan untuk membantu dalam pendeteksian biosintesis IAA. Uji kolorimetri dengan reagen Salkowski adalah salah satu metode yang telah banyak digunakan dalam mendeteksi IAA dari mikroba. Campuran dalam reagen Salkowski adalah besi klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) 0,5 M dan 35 % asam perklorat ( $\text{HClO}_4$ ) yang apabila direaksikan dengan IAA maka akan menghasilkan warna merah muda (*Pink*). Hal dikarenakan adanya pembentukan kompleks IAA dengan Fe (besi). Bakteri yang mampu menunjukkan perubahan warna yang dihasilkan adalah reaksi positif yaitu menandakan bahwa adanya senyawa indole (IAA) sebagai produk metabolisme triptofan yang dilakukan oleh bakteri (Gang et al., 2020). Artinya, bakteri yang diujikan memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA sebab mampu memetabolisme triptofan yang ditambahkan ke dalam media uji. Senyawa *L-tryptophan* sebagai prekursor IAA yang ditambahkan pada media dapat meningkatkan produksi IAA dan kultur bakteri pada media akan memicu biosintesis IAA.

Hormon IAA yang diproduksi oleh bakteri endofit akar kopi pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian (Pratiwi et al., 2020), yang memperoleh produksi IAA tertinggi dari bakteri endofit akar kopi Robusta dan Arabika masing-masing mencapai 110,73 ppm sampai dengan 257,16 ppm. Meskipun penelitian ini juga menggunakan tanaman kopi di UB Forest, namun hasil IAA yang diproduksi oleh bakteri endofit akar kopi berbeda-beda. Waktu pengambilan sampel dan pemilihan area lokasi lahan (Kopi dengan naungan dan tanpa naungan) merupakan salah satu faktor yang membedakan dari penelitian sebelumnya. Sehingga dapat dijadikan sebagai informasi bahwa selain variasi tanaman kopi, area lahan serta proses penanaman kopi dengan naungan dan tanpa naungan berpengaruh terhadap kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan IAA.

Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan IAA sangat bervariasi bergantung pada jenis isolat (jenis bakteri) dan umur kulturnya. Perbedaan jumlah konsentrasi IAA yang diproduksi bergantung pada jenis tanaman, lokasi dan faktor lingkungan. Selain itu, efek pemberian konsentrasi triptofan, suhu, pH, salinitas dan lamanya waktu inkubasi juga termasuk faktor penentu jumlah IAA yang diproduksi oleh bakteri (Napitupulu et al., 2019; Xa et al., 2022). Bagian organ tanaman juga menentukan kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan IAA. Bagian akar, batang, dan daun tanaman memiliki diversitas bakteri endofitnya masing-masing, sehingga kemampuan bakteri endofit tersebut dalam menghasilkan IAA sangat beragam. Bakteri endofit yang ditemukan di akar dan batang diketahui memiliki diversitas bakteri endofit yang melimpah dengan kemampuan penghasil IAA lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri endofit di daun (Husseiny et al., 2021).

Penelitian ini berhasil mendapatkan bakteri endofit akar tanaman kopi, baik yang ditanam dengan naungan maupun ditanam tanpa naungan. Bakteri endofit yang ditemukan pada keduanya memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Saran untuk penelitian ini selanjutnya adalah perlu dilakukan proses optimasi sehingga konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh bakteri endofit dapat lebih optimal.

## **Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa densitas bakteri di lokasi KA (Kopi dengan naungan) adalah  $17,93 \times 10^3$  CFU/gram dan lokasi KB (Kopi tanpa naungan) adalah  $26,67 \times 10^3$  CFU/gram. Diversitas bakteri di kedua lokasi berturut turut 0,84 (KA) dan 0,77 (KB). Total bakteri yang diperoleh dari kedua lokasi adalah 18 isolat. Hasil uji kualitatif menggunakan kolorimetri dengan membran nitroselulosa didapatkan sebanyak 11 isolat yang terdeteksi dapat memproduksi IAA. Sebelas isolat terpilih kemudian dikuantifikasi dengan uji kolorimetri menggunakan reagen Salkowski. Dua isolat yaitu KAA6 dan KBA2

adalah isolat yang memproduksi konsentrasi IAA tertinggi masing-masing sebesar 10,73 ppm pada inkubasi 48 jam dan 12,78 pada inkubasi 72 jam. Waktu pengambilan sampel, dan pemilihan area lokasi lahan (Kopi dengan naungan dan tanpa naungan) termasuk faktor yang mempengaruhi terhadap kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan IAA.

## Referensi

- Adedeji, A. A., & Babalola, O. . (2020). Secondary metabolites as plant defensive strategy: a large role for small molecules in the near root region. *Planta*, 252(61).
- Adeleke, B. S., Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2021). Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*, 20(July), 100433. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433>
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221(February), 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Ali, M., Ali, Q., Sohail, M. A., Ashraf, M. F., Saleem, M. H., Hussain, S., & Zhou, L. (2021). Diversity and taxonomic distribution of endophytic bacterial community in the rice plant and its prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18). <https://doi.org/10.3390/ijms221810165>
- Aragão, O. O., da Conceição Jesus, E., Oliveira-Longatti, D. S. M., de Souza, A. A., & Moreira, F. M. D. (2023). Physical, Chemical, and Microbiological Attributes as Discriminators of Coffee-Growing and Forest Sites in Different Soils in the Brazilian Atlantic Forest Biome. *J Soil Sci Plant Nutr*, 23, 6767–6776.
- Asad, S., Priyashantha, A. K. H., Tibpromma, S., Luo, Y., Zhang, J., Fan, Z., Zhao, L., Shen, K., Niu, C., Lu, L., Promputtha, I., & Karunarathna, S. C. (2023). Coffee-Associated Endophytes: Plant Growth Promotion and Crop Protection. *Biology*, 12(7), 911. <https://doi.org/10.3390/biology12070911>
- BPS. (2023). Catalog : 1101001. In *Badan Pusat Statistik Indonesia 2023*. Badan Pusat Statistik. <https://www.bps.go.id/publication/2020/04/29/e9011b3155d45d70823c141f/statistik-indonesia-2020.html>
- Bunga Hutamy, H., & Nuraini, Y. (2019). Diversity and Population of Phosphate Solubilizing Bacteria in Various Land Uses at UB Forest. *Jurnal Tanah Dan Sumberdaya Lahan*, 06(01), 1113–1122. <https://doi.org/10.21776/ub.jtsl.2019.006.1.10>
- de Souza, J. P., Vezzani, F. M., Lazeris, T. S., Kaschuk, G., de Souza, E. M., Balsanelli, E., Dick, D., Joris, H., & Bayer, C. (2023). Composition of soil organic matter and the structure and diversity of soil bacteria and archaea, in crop systems under no-till in a subtropical ecosystem. *Soil Tillage Res*, 234(105813).
- Donko, K. K., Mamadou, C., Kossi, A., Kossi, B. A., Badabate, D., Kodjovi, M. L. A., & Atsu, K. G. (2019). Typology of coffee-based agroforestry systems in the semi-deciduous forest zone of Togo (West Africa). *International Journal of Biodiversity and Conservation*,

11(7), 199–211. <https://doi.org/10.5897/ijbc2019.1291>

- Duguma, M. S., Feyssa, D. H., & Biber-Freudenberger, L. (2019). Agricultural biodiversity and ecosystem services of major farming systems: A case study in yayo coffee forest biosphere reserve, Southwestern Ethiopia. *Agriculture (Switzerland)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/agriculture9030048>
- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2020). Analysis of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in Klebsiella by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Journal of Food Legumes*, 33(3), 181–190. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3230>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd\_Allah, E. (2019). Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Husseiny, S., Dishisha, T., Soliman, H. A., Adeleke, R., & Raslan, M. (2021). Characterization of growth promoting bacterial endophytes isolated from Artemisia annua L. *South African Journal of Botany*, 143, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.042>
- Jimenez-Soto, E. (2021). The political ecology of shaded coffee plantations: conservation narratives and the everyday-lived-experience of farmworkers. *Journal of Peasant Studies*, 48(6), 1284–1303. <https://doi.org/10.1080/03066150.2020.1713109>
- Khaskheli, M. A., Wu, L., Chen, G., Chen, L., Hussain, S., Song, D., Liu, S., & Feng, G. (2020). Isolation and characterization of root-associated bacterial endophytes and their biocontrol potential against major fungal phytopathogens of rice (Oryza sativa L.). *Pathogens*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030172>
- Maredia, M. K. (2023). *Coffee 's innovation crisis*. 1–13.
- Napitupulu, T. P., Kanti, A., & Sudiana, I. M. (2019). Evaluation of the Environmental Factors Modulating Indole-3-acetic Acid (IAA) Production by Trichoderma harzianum InaCC F88. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012060>
- Narango, D. L., Tallamy, D. W., Snyder, K. J., & Rice, R. A. (2019). Canopy tree preference by insectivorous birds in shade-coffee farms: Implications for migratory bird conservation. *Biotropica*, 51(3), 387–398. <https://doi.org/10.1111/btp.12642>
- Pratiwi, E. R., Ardyati, T., & Suharjono, S. (2020). Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria of Coffea canephora and Coffea arabica L. in UB Forest. *The Journal of Experimental Life Sciences*, 10(2), 119–126. <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2020.010.02.07>
- Purba, I. G., Warsito, K., & Refnizuida, R. (2023). Escalation Of Coffee Plant (Coffea arabica L) By Addition Of Microcapsules From IAA (Indole Acetic Acid) Producing-Endophytic Bacteria. *Jurnal Pembelajaran Dan Biologi Nukleus*, 9(1), 181–191. <https://doi.org/10.36987/jpbn.v9i1.3907>
- Roswell, M., Dushoff, J., & Winfree, R. (2021). A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos*, 130(3), 321–338. <https://doi.org/10.1111/oik.07202>
- Siles, P., Cerdán, C. R., & Staver, C. (2022). Smallholder Coffee in the Global Economy—A

Framework to Explore Transformation Alternatives of Traditional Agroforestry for Greater Economic, Ecological, and Livelihood Viability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6(April), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.808207>

Suharjono, & Yuliatin, E. (2022). Bacteria communities of coffee plant rhizosphere and their potency as plant growth promoting. *Biodiversitas*, 23(11), 5822–5834. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d231136>

Wang, L., Lin, H., Dong, Y., Li, B., & He, Y. (2019). Effects of endophytes inoculation on rhizosphere and endosphere microecology of Indian mustard (*Brassica juncea*) grown in vanadium-contaminated soil and its enhancement on phytoremediation. *Chemosphere*, 240(124891).

Xa, L. T., Nghia, N. K., & Tecimen, H. B. (2022). Environmental Factors Modulating Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis by Four Nitrogen Fixing Bacteria in a Liquid Culture Medium. *Environment and Natural Resources Journal*, 20(3), 279–287. <https://doi.org/10.32526/enrj/20/202100233>