

## KAJIAN APLIKASI BAKTERI ENDOFIT DIAZOTROF PADA TEBU (*Saccharum officinarum* L.) VARIETAS PS 851 DAN PS 864

Kustia Wardani, Wiwik Eko Widayati, Langkah Sembiring

Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

### Abstrak

Aplikasi bakteri endofit diazotrof sebagai biofertilizer untuk tebu varietas PS 851 dan PS 864 perlu dilakukan untuk mengoptimalkan efek aplikasi bakteri terhadap tebu. Penelitian ini dilakukan di rumah kaca dengan varietas tebu uji PS 851 dan PS 864, sedangkan isolat bakteri endofit diazotrof yang digunakan adalah *Azospirillum lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup>, isolat dengan kode JAc 921 A dan JAc 951 A. Keempat isolat tersebut ditandai dengan penanda molekular *Green Fluorescent Protein* (GFP) dan diinokulasikan melalui daun atau akar pada tebu umur 15 hari dan 30 hari. Pengamatan yang dilakukan terhadap parameter agronomis meliputi keragaan (tinggi dan jumlah anakan), keberadaan bakteri dalam jaringan, berat kering tebu, dan serapan hara N, P, K tebu. Data yang didapatkan kemudian dianalisis dengan Rancangan Acak Lengkap 4 faktor. Analisis yang telah dilakukan menunjukkan bahwa respon varietas PS 851 terhadap inokulasi bakteri lebih baik dari varietas PS 864. Dari keempat isolat bakteri yang digunakan, bakteri *Azospirillum lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> adalah isolat yang paling sesuai dengan varietas PS 851 dan PS 864 sedangkan bakteri JAc 951 cukup sesuai dengan varietas PS 851. Selain itu, semua isolat bakteri yang digunakan dapat masuk dan berkembang dalam jaringan tebu baik melalui daun maupun akar dan metode tidak berpengaruh terhadap jumlah bakteri yang berhasil masuk dalam tebu. Aplikasi bakteri endofit diazotrof pada saat tebu berumur 15 hari tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan inokulasi umur 30 hari. Kompatibilitas bakteri endofit diazotrof uji, terutama *Azospirillum lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> terhadap kedua varietas tebu unggulan tersebut cukup tinggi dan dapat diaplikasikan pada umur 15 maupun 30 hari melalui daun maupun akar tebu.

### Kata kunci:

### PENDAHULUAN

Beberapa tahun terakhir banyak ilmuwan tertarik untuk meneliti bakteri endofit yang hidup dalam jaringan tumbuhan sehat. Melalui penelitian mereka diketahui bahwa keberadaan bakteri endofit tersebut tidak menimbulkan penyakit bagi tumbuhan hospesnya bahkan dapat menguntungkan karena kemampuannya untuk menambat nitrogen, sintesis fitohormon, melarutkan P dan Zn, maupun sebagai agen biokontrol dan bioremediasi (Germaine *et al.*, 2006 ; Saravanan *et al.*, 2007). Dari hasil penelitian tersebut, ilmuwan mulai mengembangkan ide untuk memanfaatkan bakteri endofit untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas produk tanaman pertanian.

Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit (Di Fiore & Del Gallo, 1995). Bakteri ini masuk ke dalam tanaman dan membentuk asosiasi nonsimbiotik, yaitu bentuk asosiasi tanpa pembentukan nodul seperti yang terjadi antara *Rhizobium* dan *Bradyrhizobium* dengan tanaman Legume. Hampir semua jenis bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari jaringan tumbuhan sehat juga ditemukan di rizosfer tanaman tersebut kecuali beberapa jenis bakteri obligat endofit seperti *Gluconacetobacter diazotrophicus* dan *Herbaspirillum rubrisubalbicans* yang hanya dapat ditemukan di dalam tebu dan tidak ditemukan di rizosfer (Baldany *et al.*, 1997). Kolonisasi endofitik ini merupakan suatu proses aktif yang melibatkan kontrol dari bakteri maupun tanaman, sehingga kesesuaian bakteri endofit dengan tanaman merupakan faktor yang harus diperhatikan dalam setiap aplikasi bakteri endofit (Dong *et al.*, 2003 ; Di Fiore & Del Gallo, 1995).

Fenomena keberhasilan penanaman tebu di Brazil selama bertahun-tahun tanpa pemberian pupuk anorganik menguatkan dugaan adanya kontribusi bakteri diazotrof endofit terhadap BNF tebu sehingga kemudian ditemukan berbagai jenis bakteri endofit diazotrof dalam jaringan tebu, antara lain *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropediceae*, *Azospirillum* spp., anggota genus *Burkholderia*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, dan *Bacillus* (Rennie *et al.*, 1982 ; Caballero-Melado *et al.*, 1995 ; Boddey *et al.*, 2003). Di antara jenis-jenis bakteri endofit tersebut, *G. diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*) dan *H. rubrisubalbicans* merupakan 2 jenis endofit tebu yang paling banyak dipelajari.

Tebu sendiri saat ini merupakan salah satu komoditi yang sangat penting, tidak hanya bagi industri gula, namun juga sebagai bahan baku energi alternatif berupa bioetanol yang sedang digalakkan. Peningkatan produksi tebu terus diupayakan untuk memenuhi kebutuhan tersebut, antara lain dengan upaya pemuliaan yang dilakukan secara terus menerus dan berkesinambungan, dan juga upaya peningkatan produksi melalui penggunaan pupuk. Namun penggunaan pupuk kimiawi secara terus menerus dapat merusak struktur tanah dan mencemari lingkungan, sehingga penggunaan pupuk hayati atau *biofertilizer* sangat dianjurkan. Selain itu, penggunaan pupuk kimiawi juga memakan biaya yang cukup besar. Penggunaan pupuk hayati yang lebih murah dan ramah lingkungan diharapkan dapat mengurangi biaya produksi petani tebu dan juga mengurangi pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh pupuk kimiawi.

Penghitungan dengan menggunakan N<sup>15</sup> pada penelitian yang dilakukan di Brazil menunjukkan bahwa bakteri endofit diazotrof mampu berperan pada BNF tebu sekitar 25-60% dari total N yang dibutuhkan tanaman (Boddey *et al.*, 1991). Hasil yang paling maksimal ditunjukkan oleh penginokulasian tebu dengan *G. diazotrophicus* yang dilakukan oleh Muthukumarasamy *et al.* (2003). Namun hasil ini masih menunjukkan berbagai variasi dan tidak konsisten untuk aplikasi pada varietas tebu yang berbeda, tergantung pada kapasitas dan kesesuaian bakteri endofit dengan varietas uji (Boddey *et al.*, 2003).

Bakteri endofit dapat memasuki jaringan tanaman melalui *lateral root crack*, stomata, hidatoda, perlukaan alami maupun buatan (James & Sprent, 1995), sehingga aplikasi bakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode. Inokulasi bakteri endofit pada penelitian sebelumnya dilakukan dengan menyiramkan suspensi bakteri di sekitar akar tanaman (Susianawati, 2008), namun tidak menutup kemungkinan inokulasi dapat dilakukan melalui daun dengan cara disemprotkan di sekitar stomata. Bakteri yang berhasil masuk ke dalam jaringan akan beraktivitas dan berpengaruh terhadap perkembangan tanaman pada tahap yang berbeda-beda, sesuai dengan jenis bakteri yang diinokulasikan (Oliviera *et al.*, 2002). Dengan adanya ketiga faktor tersebut, maka penelitian lebih jauh mengenai penggunaan bakteri endofit diazotrof sebagai *biofertilizer* tebu masih perlu dilakukan.

Penelitian berkesinambungan yang dilakukan oleh Widayati (1996) di Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) telah berhasil mengisolasi lebih dari 10 isolat bakteri endofit dari dalam jaringan tebu. Sebagian besar bakteri tersebut merupakan bakteri penambat Nitrogen dan pelarut fosfat walaupun belum semua isolat teridentifikasi hingga tingkat spesies. Isolat bakteri *Klebsiella* sp. JAc 921 A dan *Klebsiella* sp. JAc 951 A merupakan 2 isolat hasil isolasi di P3GI yang mampu menambat Nitrogen, sedangkan *Azospirillum lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> dan *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup> diperoleh dari *Culture Collection*. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Susianawati *et al.* (2008) menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut terbukti mampu menginfeksi jaringan tebu muda dan meningkatkan karakteristik agronomi tebu. Namun penelitian lebih lanjut untuk mengetahui metode aplikasi yang paling tepat bagi keempat jenis bakteri tersebut perlu dilakukan untuk memaksimalkan potensi kontribusi bakteri endofit terhadap peningkatan karakteristik tanaman tebu, terutama untuk varietas tebu unggulan PS 851 dan PS 864.

## METODE

### 1. Isolat Bakteri Endofit yang Digunakan

Dalam penelitian ini digunakan 4 isolat bakteri yaitu *Azospirillum lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> dan *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup> dari *Culture Collection*, sedangkan isolat bakteri dengan kode *Klebsiella* sp. JAc 921 A dan *Klebsiella* sp. JAc 951 A diperoleh dari Laboratorium Biologi Tanah P3GI dan merupakan hasil isolasi dari jaringan tebu yang dilakukan di

P3GI. Selain itu, dalam penelitian ini juga digunakan bakteri recombinan *Eschericia coli* S17.1 PFAJ 1819 yang mengandung gen plasmid Tn + Kn + *gfp* sebagai bakteri pembawa gen *gfp* untuk penanda molekular bakteri uji.

## 2. Karakterisasi Isolat Bakteri yang Digunakan

Karakterisasi aktivitas nitrogenase isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan teknik Acetylene Reduction Assay (ARA) dan karakterisasi fenotipik dengan menggunakan Tes API 20 NE.

## 3. Penandaan Isolat Bakteri endofit diazotrof yang digunakan

### 3.1. Persiapan Isolat Bakteri yang Digunakan

Isolat bakteri *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, *G. diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup>, *Klebsiella* sp. JAc 921 A, dan *Klebsiella* sp. JAc 951 A ditumbuhkan dalam medium yang mengandung Riffampicyn 70 µg/ml selama 2 hari sehingga bakteri mengalami *spontaneous mutagenesis*. Koloni yang tumbuh kemudian dipindahkan dan ditumbuhkan pada medium padat dengan Riffampicyn 50 µg/ml selama 2 hari. Sebagian isolat yang tumbuh kemudian dipindahkan dalam medium LB (Luria Bertani) cair yang mengandung Riffampicyn 50 µg/ml (LB + Riff 50 µg/ml) selama semalam.

### 3.2. Persiapan Isolat Pembawa Gen *gfp*

Isolat *E. coli* S17.1 yang mengandung plasmid Tn + Kn + *gfp* ditumbuhkan semalam dalam medium LB cair yang mengandung Kanamicyn 50 µg/ml dan Ampicilin 50 µg/ml (LB + Kn 50 µg/ml + Amp 50 µg/ml).

### 3.3. Penandaan Isolat dengan GFP

Sebanyak 750 µl suspensi *E. coli* S17.1 dan 750 µl suspensi isolat *Azospirillum lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup>, JAc 921 A, dan JAc 951 A dalam LB + Riff 50 µg/ml dicampurkan kemudian disentrifus dengan menggunakan Centrifuge Eppendorf 5415 C pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatant hasil sentrifus dibuang kemudian ditambah dengan 500 µl 10 mM MgSO<sub>4</sub> dan disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pellet hasil sentrifus dicampur dengan 30 µl 10 mM MgSO<sub>4</sub> dan diteteskan di atas kertas saring steril yang diletakkan di tengah medium LB + Kn 50 µg/ml + Riff 50 µg/ml dan diinkubasi semalam. Hasil konjugasi pada kertas saring dikerok dan dilarutkan dalam air steril 250-400 µl untuk diplating pada medium LB + Kn 50 µg/ml + Riff 50 µg/ml. Koloni yang tumbuh kemudian dilihat dengan menggunakan Iluminator UV. Koloni yang berpendar hijau merupakan koloni yang mengandung gen *gfp* dan disimpan dalam gliserol 12 %.

## 4. Pembibitan dan Penanaman Tebu

Bibit tebu PS 851 dan PS 864 ditumbuhkan dalam medium campuran pasir dan tanah selama 14 hari. Bibit tersebut kemudian ditumbuhkan dalam pot yang berisi 5 kg tanah dan diberi pupuk N 50 % (1 gr/5 kg), P 100 % (0,5 g/5 kg) dan K 100 % (0,5 g/5 kg). Tebu yang terdiri atas varietas PS 851 dan PS 864 ditanam di rumah kaca sebanyak 120 pot dengan rincian perlakuan antara lain metode pemberian bakteri pada tebu melalui daun dan pemberian melalui akar ; dan pemberian perlakuan bakteri pada 15 hari sesudah tanam dan 30 hari sesudah tanam, masing-masing dengan ulangan sebanyak 3 kali. Bakteri yang digunakan antara lain bakteri *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, *G diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup>, *Klebsiella* sp. JAc 921 A, dan *Klebsiella* sp. JAc 951 A. Kontrol untuk percobaan ini adalah tebu dengan N 50 %, P 100 % dan K 100 % tanpa pemberian bakteri. Rancangan percobaan yang dipakai adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) 4 faktor dan analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program Statistix seri 9.

## 5. Inokulasi Isolat berpenanda GFP pada Tebu

### 5.1. Persiapan Kultur

Masing-masing isolat yang telah mengandung gen *gfp* ditumbuhkan dalam LB + Kn 50 µg/ml + Riff 50 µg/ml sebanyak 100 ml selama 24 jam (starter I). Suspensi bakteri tersebut disentrifus dengan menggunakan *Centrifuge Beckmen* pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.

Supernatan hasil sentrifus dibuang kemudian pelet dilarutkan dalam 60 ml akuades steril. Dari 60 ml akuades tersebut kemudian dibagi menjadi 40 ml untuk perlakuan inokulasi melalui daun dan 20 ml untuk perlakuan inokulasi melalui akar. Larutan tersebut kemudian diencerkan menjadi 50% konsentrasi awal dan diambil 1 ml untuk penghitungan jumlah bakteri.

## 5.2. Inokulasi Kultur Bakteri pada Tebu

Untuk inokulasi melalui daun, masing-masing isolat sebanyak 80 ml suspensi bakteri yang telah dipersiapkan sebelumnya, dimasukkan ke dalam alat semprot yang telah disterilkan dengan alkohol 70%. Tiap tanaman disemprot suspensi bakteri sebanyak 1 ml ( $\pm 2$  kali semprot) pada permukaan bawah daun ke-3 tebu. Penomoran daun didasarkan pada sistem Kujiper. Untuk inokulasi melalui akar, masing-masing suspensi isolat diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan dalam akuades steril menjadi 10x. Suspensi bakteri tersebut kemudian dituangkan di sekitar akar tebu secara merata.

## 6. Deteksi Keberadaan Bakteri Berpenanda GFP dalam Jaringan Tebu

Deteksi keberadaan bakteri dalam jaringan tebu dilakukan dengan cara reisolasi bakteri berpenanda molekuler dari jaringan tebu. Reisolasi bakteri dilakukan 7 hari setelah waktu aplikasi dengan cara memotong daun ketiga tanaman tebu, kemudian daun tersebut ditimbang untuk pengukuran berat basah daun. Selanjutnya daun dipotong-potong dan disterilisasi menggunakan larutan Na-hipoklorit 20% dan dibilas dengan akuades steril. Daun kemudian diambil sarinya dan dibuat seri pengenceran  $10^{-1} - 10^{-5}$ . Sebanyak 100  $\mu$ l suspensi dari pengenceran bakteri tingkat  $10^{-2} - 10^{-4}$  dikultivasi ke dalam medium LB + Kn 50  $\mu$ g/ml dan diinkubasi selama dua hari. Pengamatan terhadap koloni bakteri dilakukan dibawah illuminator UV dan dihitung jumlah bakteri yang menunjukkan pendaran hijau.

## 7. Pengamatan dan Analisis Kandungan N, P, dan K Organik

Pengamatan keragaan dan pemanenan tebu dilakukan setelah tebu berumur 3 bulan. Tebu dipisahkan antara akar serta gabungan batang dan daun. Setelah itu, masing-masing ditimbang berat basah dan dikeringkan dengan menggunakan oven Memmert hingga beratnya konstan lalu ditimbang kembali untuk mengetahui berat kering jaringan. Jaringan yang kering digiling hingga halus dan dianalisis kandungan N, P, dan K organiknya. Analisis serapan hara N, P, K tebu dilakukan berdasarkan Prosedur Analisis Kimia Jaringan di Laboratorium Kimia Tanah P3GI.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Karakterisasi Isolat Bakteri yang Digunakan

#### 1.1. Tes ARA

Analisis ARA (*Acetylene Reduction Assay*) merupakan suatu uji yang mudah dan sensitif untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas enzim nitrogenase pada suatu jenis bakteri. Hasil tes ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas Nitrogenase pada tiap isolat

No	Nama Isolat	Medium	
		Nfb	MGO
1	1247	++	++
2	5601	++	++
3	JAc 951 A	++	++
4	JAc 951 A	++	++

Dari Tabel 2 tersebut dapat diketahui bahwa keempat isolat yang dipakai dalam penelitian ini mempunyai aktivitas nitrogenase, yaitu ditunjukkan oleh kadar (area) etilen yang terbaca oleh gas kromatografi. Gas etilen yang diinjeksikan dalam tabung diubah menjadi asetilen oleh komponen nitrogenase bakteri (Rao *et al.* 1999). Dengan demikian, keempat jenis bakteri tersebut mampu memfiksasi Nitrogen dari atmosfer dan mentransfernya pada tanaman hospes untuk digunakan dalam proses metabolisme.

## 1.2. Tes API

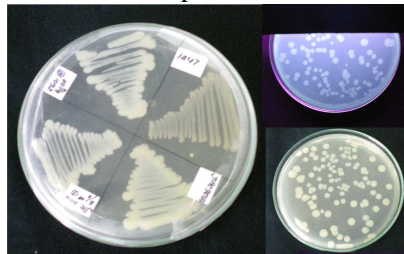
Karakterisasi kemampuan fisiologis keempat isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diuji dengan menggunakan tes API 20 NE. Seri tes API 20 NE khusus digunakan untuk identifikasi bakteri non anggota enterobakter dan hasilnya disajikan pada Tabel 2. Dari uji tersebut diketahui bahwa keempat isolat bakteri mampu menggunakan berbagai macam jenis gula sebagai sumber karbon utama dan menghasilkan enzim katalase. Keempat isolat tersebut juga tidak mampu menggunakan triptofan sebagai substrat respirasinya sehingga menghasilkan karakter negatif dalam uji penghasilan indol. Mirza *et al.* (2001) menyatakan bahwa dalam kultur *in vitro*, bakteri akan menggunakan triptofan sebagai prekursor penghasilan IAA ketika berada dalam kondisi kekurangan substrat sehingga IAA akan mulai dihasilkan setelah kultur ditumbuhkan selama 14 hari. Dalam karakterisasi fisiologis ini, kit Api 20 NE tidak menyediakan kondisi starvasi tersebut.

Tabel 2. Karakter fisiologis isolat bakteri berdasarkan tes API 20NE

NO.	UJI KARAKTER	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	<i>G.</i> <i>diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	<i>Klebsiella</i> sp. JAc 921 A	<i>Klebsiella</i> sp. JAc 951 A
1	Reduksi NO <sub>3</sub>	-	+	+	+
2	Penghasilan indole	-	-	-	-
3	Penggunaan glukosa	-	+	+	+
4	Penghasilan enzim arginin dihidrolase	-	-	-	-
5	Penghasilan enzim urease	-	+	+	-
6	Penghasilan enzim arginin dihidrolase	-	+	+	+
7	Penghasilan enzim protease	+	-	+	-
8	Penghasilan enzim β-glucosidase	-	+	+	+
9	Asimilasi glukosa	+	+	+	+
10	Asimilasi arabinosa	+	+	+	+
11	Asimilasi manosa	+	+	+	+
12	Asimilasi manitol	+	+	+	+
13	Asimilasi N-asetilglukosamin	+	+	+	+
14	Asimilasi maltosa	+	+	+	+
15	Asimilasi potassium glukonat	+	+	+	+
16	Asimilasi asam kuprat	-	-	+	-
17	Asimilasi asam adipat	+	+	-	+
18	Asimilasi malat	-	+	+	+
19	Asimilasi asam sitrat	-	+	+	+
20	Asimilasi trisodium sitrat	-	-	+	+
21	Penghasilan katalase	+	+	+	+

## 2. Penandaan Isolat Bakteri endofit diazotrof yang digunakan

Penandaan isolat bakteri *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, *G. diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup>, *Klebsiella* sp. JAc 921 A, dan *Klebsiella* sp. JAc 951 A dengan penanda molekuler berupa gen *gfp* menghasilkan isolat yang dapat memancarkan pendar hijau ketika dipapar dengan sinar UV atau sinar biru gelombang pendek. Gambar keempat isolat tersebut disajikan pada Gambar 1.

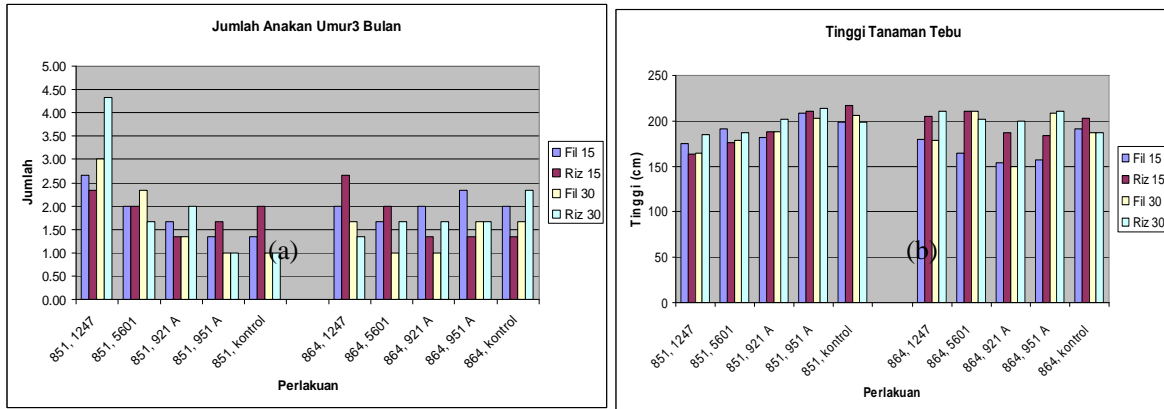


Gambar 1. Isolat bakteri dengan penanda molekuler GFP

Dalam penelitian ini, penanda GFP digunakan untuk menandai bakteri inokulum yang diinokulasikan ke dalam jaringan tebu sehingga memudahkan penelusuran dan bakteri dapat direisolasi dari jaringan tanpa harus tercampur dengan bakteri *indigenou*s yang secara alami sudah berada dalam jaringan tebu. Penandaan ini dilakukan dengan menkonjugasikan gen *gfp* yang terdapat dalam *Eschericia coli* pada kromosom bakteri target sehingga dihasilkan bakteri rekombinan yang mampu mengekspresikan gen *gfp*.

### 3. Keragaan Tebu

Efek inokulasi bakteri terhadap tebu dapat diketahui dengan pengamatan keragaan yang meliputi jumlah anakan dan tinggi tanaman tebu yang setiap bulan (Shankaraiah, 2006). Gambar 2a. merupakan gambaran keseluruhan dari pengaruh perlakuan terhadap jumlah anakan tebu umur 3 bulan dan Gambar 2b. merupakan hasil dari pengukuran tinggi tanaman tebu umur 3 bulan.



Gambar 2. Rerata (a) jumlah anakan tebu dan (b) tinggi tanaman tebu umur 3 bulan

Secara umum, karakter alami varietas PS 851 berbeda dengan varietas PS 864, tapi tidak untuk jumlah anakan. Perbedaanya terletak pada anakan varietas PS 864 yang muncul secara serempak di masa awal perkembangan tebu (Anonim, 1998). Dari Gambar 2a. diketahui bahwa varietas PS 851 menunjukkan respon yang lebih baik daripada PS 864, yaitu terlihat pada jumlah rata-rata anakan tebu varietas PS 851 yang lebih banyak dari varietas PS 864, dan diantara semua jenis bakteri yang diinokulasikan, bakteri *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> memberikan efek yang terbaik (Tabel 3.). Untuk tinggi tanaman, varietas PS 851 secara alami lebih tinggi daripada varietas PS 864 (Gambar 2b.) sehingga hasil tersebut bisa dikatakan bukan merupakan efek dari inokulasi bakteri terhadap tebu. Selain karena faktor perbedaan tahap perkembangan dan fisiologis bibit tebu (Van Dellewijn, 1952), pengurangan dosis pupuk N hingga 50% juga berpengaruh terhadap keragaan menjadi kurang optimal karena kedua tebu komersial tersebut diketahui membutuhkan pupuk N dalam jumlah yang tinggi (Anonim, 1998). Akibatnya, terdapat beberapa tebu perlakuan dengan hasil yang kurang baik bila dibandingkan dengan kontrol tetapi secara statistik tidak berbeda nyata (Tabel 4.)

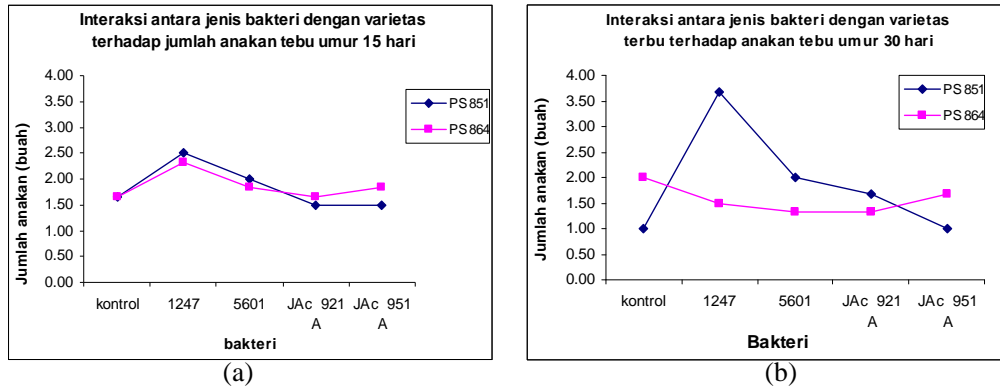
Tebu yang diaplikasi melalui akar menunjukkan jumlah anakan yang lebih tinggi namun tidak berbeda nyata dengan aplikasi melalui daun. Metode dan waktu aplikasi bakteri juga tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap tinggi tebu varietas PS 851 dan PS 864. Pengaruh yang signifikan ditunjukkan oleh jenis bakteri inokulan dan waktu aplikasi terhadap varietas yang disajikan pada Tabel 3 dan interaksinya pada Gambar 3. Interaksi antara varietas tebu dengan strain bakteri yang digunakan disajikan pada Gambar 4.

Tabel 3. Pengaruh strain bakteri dan waktu aplikasi terhadap jumlah anakan tebu PS 851 dan PS 864 (buah)

Varietas	Bakteri	Waktu inokulasi	
		15 hari	30 hari
PS 851	Kontrol	1.67 bcd	1.00 e
	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	2.50 b	3.67 a
	<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	2.00 bc	2.00 bc
	<i>Klebsiella</i> sp. Jac 921 A	1.5 cd	1.67 bcd
	<i>Klebsiella</i> sp. Jac 951 A	.5 cd	1.00 e
PS 864	Kontrol	1.67 bcd	2.00 bc
	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	2.33 bc	1.5 cd
	<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	1.83 bcd	1.33 de
	JAc 921 A	1.67 bcd	1.33 de
	JAc 951 A	1.83 bcd	1.67 bcd

BNT = 0.8585,  $\alpha = 0.05$

Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata

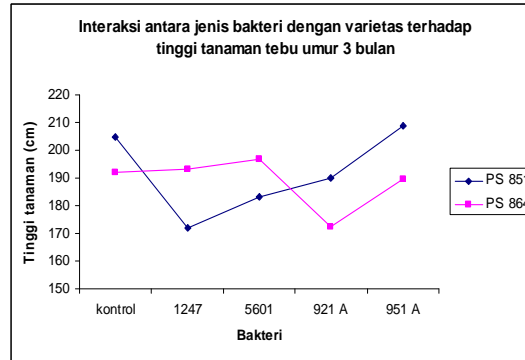


Gambar 3. Interaksi antara jenis bakteri dan varietas pada watu inokulasi (a) 15 hari dan (b) 30 hari

Tabel 4. Pengaruh jenis bakteri inokulan terhadap tinggi tanaman tebu varietas PS 851 dan PS 864 (cm)

Bakteri	Varietas	
	PS 851	PS 864
Kontrol	205 a	192.08 ab
<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	172.08 b	193.33 ab
<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	183.33 ab	196.67 a
<i>Klebsiella</i> sp. JAc 921 A	190 ab	172.5 b
<i>Klebsiella</i> sp. JAc 951 A	208.75 a	189.58 ab

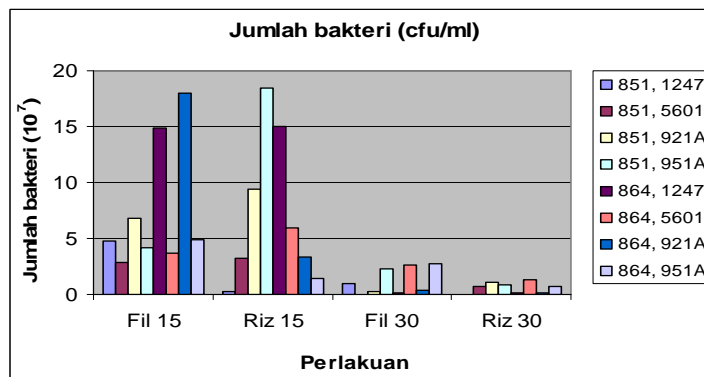
BNT = 21.225,  $\alpha = 0.05$   
 Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata



Gambar 4. Interaksi antara jenis bakteri dengan varietas tebu terhadap tinggi tanaman tebu umur 3 bulan

### 3. Deteksi Keberadaan Bakteri dalam Jaringan Tebu

Reisolasi bakteri berpenanda molekuler dari daun yang dilakukan 7 hari setelah aplikasi dilakukan untuk melihat tingkat keberhasilan metode aplikasi bakteri terhadap tebu. Hasil reisolasi tersebut disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Rerata jumlah bakteri dari daun (cfu/ml)

Rata-rata jumlah bakteri dalam jaringan pada aplikasi 15 hari setelah tanam secara signifikan lebih tinggi dari pada jika bakteri diinokulasikan pada 30 hari (Lampiran 3.). Tebu yang berusia 30 hari telah mengalami pertumbuhan dan pertambahan biomasa lebih banyak dibanding tebu umur 15 hari, sedangkan jumlah bakteri yang diinokulasikan sekitar  $10^{11}$  cfu/ml. Akibatnya, terjadi pengenceran oleh biomassa ketika bakteri direisolasi dan jumlahnya pun menjadi lebih sedikit.

Jumlah bakteri yang berhasil masuk pada varietas PS 864 lebih tinggi jika dibandingkan dengan varietas PS 851, terutama untuk bakteri dengan *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>. Uji statistik yang dilakukan juga menunjukkan adanya interaksi yang cukup signifikan antara varietas tebu dengan jenis bakteri dan metode inokulasi (Tabel 5.) dan interaksinya disajikan pada Gambar 6. Tebu varietas PS 851 menunjukkan interaksi dengan bakteri yang lebih stabil dan semua jenis bakteri dapat masuk ke dalam dan tumbuh dalam jaringannya dengan lebih baik terutama bakteri *Klebsiella* sp. JAc 951 A. Dalam penelitian ini, varietas PS 864 lebih sesuai dengan bakteri *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> sehingga jumlah bakteri dalam jaringannya lebih besar dari pada jenis yang lain. Tetapi efek bakteri terhadap karakteristik agronomi varietas PS 851 terbukti lebih baik karena respon varietas PS 851 terhadap inokulasi bakteri lebih baik daripada varietas PS 864.

Rata-rata jumlah bakteri yang dapat masuk melalui daun lebih banyak dari pada bakteri yang dapat masuk melalui akar, kemungkinan karena bakteri yang diaplikasi melalui akar belum sampai ke daun atau karena adanya kompetisi dengan bakteri *endogenous* tanah. Penyebaran



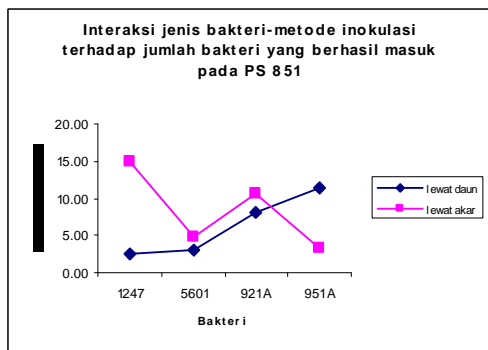
bakteri memerlukan waktu 7-10 hari untuk sampai pada jaringan daun (Reiss *et al.*, 1994). Beberapa jenis bakteri endofit diazotrof seperti *G. diazotrophicus* tidak dapat bertahan lama dalam tanah sehingga prosentase keberhasilannya menginfeksi akar tebu menjadi lebih kecil (Muthukumarasamy, 2002). Namun demikian, uji statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua metode tersebut, sehingga metode aplikasi kurang berpengaruh terhadap keberhasilan bakteri untuk menginfeksi jaringan tanaman.

Keberhasilan bakteri inokulan untuk dapat masuk juga dipengaruhi oleh adanya bakteri endofit residen dalam tebu. Bakteri endofit residen disebarkan melalui perkembangbiakan secara vegetatif sehingga *budchip* tebu secara alami sudah mengandung bakteri endofit residen. Jumlah inokulum bakteri awal adalah  $10^{11}$  cfu/ml, sedangkan rata-rata jumlah bakteri yang masuk ke dalam jaringan hanya  $10^7$  cfu/ml. Adanya endofit residen membatasi jumlah bakteri inokulan untuk dapat masuk dan memberi efek terhadap tebu (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006 ; Dong *et al.*, 2003).

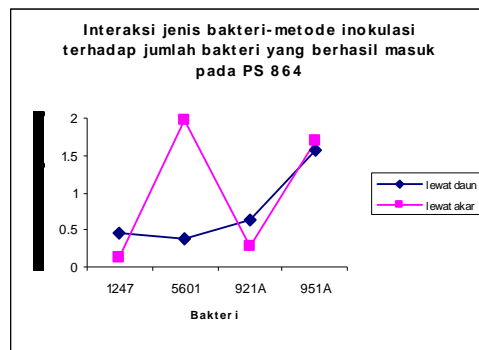
Table 5. Pengaruh jenis bakteri dan metode inokulasi terhadap jumlah bakteri yang berhasil masuk pada varietas PS 851 dan PS 864 (cfu/ml)

Varietas	Bakteri	Metode	
		Lewat daun	Lewat akar
PS 851	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	2,515 a	14,972 b
	<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	3,030 a	4,777 a
	<i>Klebsiella</i> sp. JAc 921 A	8,082 ab	10,623 b
	<i>Klebsiella</i> sp. JAc 951 A	11,280 b	3,168 a
PS 864	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	0,463 a	0,138 a
	<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	0,383 a	1,974 a
	<i>Klebsiella</i> sp. JAc 921 A	0,633 a	0,269 a
	<i>Klebsiella</i> sp. JAc 951 A	1,562 a	1,686 a

BNT = 5.7876,  $\alpha = 0.05$   
 Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata



(a)

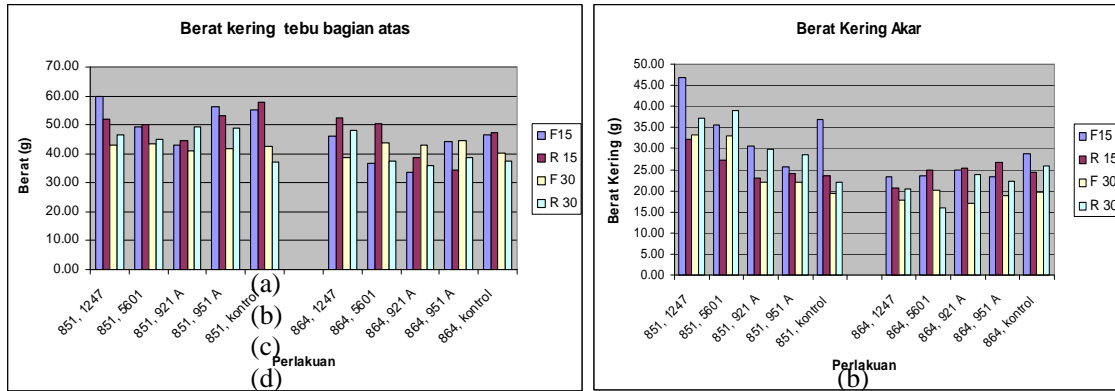


(b)

Gambar 6. Interaksi antara jenis bakteri dan waktu inokulasi terhadap jumlah bakteri yang berhasil masuk dalam varietas (a) PS 851 dan (b) PS 864

#### 4. Berat Kering Tebu

Efek inokulasi bakteri terhadap karakteristik biomassa tebu dapat diamati pada akhir masa tanam yaitu pada saat usia tebu mencapai 3 bulan yang meliputi berat kering akar dan tebu bagian atas (Saklani *et al.*, 2006). Korelasi ini terjadi karena biomassa tanaman sangat bergantung pada ketersediaan hara bagi tanaman dan bakteri diharapkan dapat berkontribusi terhadap ketersediaan hara, terutama untuk penambahan  $N_2$  (Urquiaga *et al.*, 1992). Hasil pengamatan berat kering tebu bagian atas ini disajikan pada Gambar 7a. dan berat kering akar pada Gambar 7b.



Gambar 7. Rerata berat kering tebu (a) bagian atas (b) akar

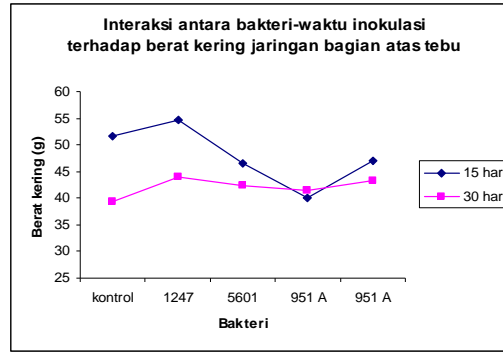
Secara garis besar, bakteri berkontribusi terhadap peningkatan berat kering tebu bagian atas dan akar PS 851 yaitu ditunjukkan oleh berat kering yang lebih tinggi dari kontrol dan varietas PS 864, terutama untuk strain *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>. Perbedaan ini secara statistik tidak signifikan untuk berat kering tebu bagian atas (Tabel 6.) tapi cukup signifikan untuk berat kering akar (Tabel 7.). Respon varietas PS 851 terhadap inokulasi bakteri lebih baik dan berat keringnya pun lebih tinggi karena adanya interaksi yang sangat kompleks antara bakteri endofit-tebu-dan bakteri endofit residen dalam tebu itu sendiri (Suman *et al.*, 2005).

Metode aplikasi setiap jenis bakteri tidak berpengaruh signifikan terhadap berat kering tebu bagian atas tetapi waktu aplikasi menunjukkan pengaruh yang cukup besar. Dari Tabel 6. diketahui bahwa tebu yang diinokulasi dengan bakteri pada umur 30 hari mempunyai berat kering yang lebih tinggi dari kontrol. Interaksi antara jenis bakteri inokulan dengan waktu aplikasi terhadap berat kering tebu bagian atas disajikan pada Gambar 8. Oliviera *et al.* (2002) dalam tulisannya menyebutkan adanya kemungkinan bahwa jenis bakteri endofit yang berbeda berpengaruh terhadap tahap pertumbuhan tanaman yang juga berbeda karena adanya interaksi yang kompleks antara bakteri dengan tebu.

Sedangkan pada berat kering akar tebu, metode aplikasi lewat daun lebih baik dari pada lewat akar dan waktu aplikasi paling baik adalah saat tebu berumur 15 hari, kecuali untuk varietas PS 864 yang berumur 30 hari (Tabel 8.). Interaksi ini disajikan pada Gambar 12. Dari hasil reisolasi bakteri diketahui bahwa bakteri dapat memasuki tebu dengan lebih baik jika inokulasi dilakukan melalui daun. Selain itu, terdapat interaksi yang kompleks diantara komunitas endofitik yang berbeda dalam jaringan tumbuhan pada tahap pertumbuhan yang berbeda (Oliviera *et al.*, 2002 ; Suman *et al.*, 2005). Umur 15 hari kemungkinan merupakan tahap pertumbuhan tebu yang tepat bagi bakteri endofit untuk mempengaruhi perakaran tebu.

Tabel 6. Pengaruh jenis bakteri inokulan dengan waktu aplikasi terhadap berat kering tebu bagian atas (g)

Bakteri	Waktu inokulasi	
	15 hari	30 hari
Kontrol	51.715 a	39.414 b
<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	52.658 a	44.099 ab
<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	46.638 ab	42.499 ab
<i>Klebsiella</i> sp. JAc 921 A	40.056 b	42.38 ab
<i>Klebsiella</i> sp. JAc 951 A	47.029 a	43.393 ab
BNT = 6.8629, $\alpha = 0.05$ Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata		



Gambar 8. Interaksi antara bakteri dengan waktu inokulasi terhadap berat kering tebu bagian atas

Tabel 7. Pengaruh jenis bakteri terhadap berat kering akar tebu (g)

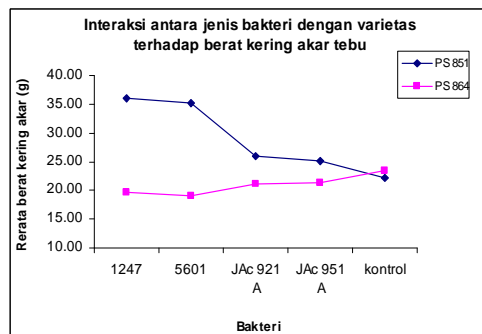
Bakteri	Varietas	
	PS 851	PS 864
Kontrol	25.392 <sup>bc</sup>	24.64 <sup>bc</sup>
<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	37.411 <sup>a</sup>	20.643 <sup>c</sup>
<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	33.709 <sup>a</sup>	21.144 <sup>bc</sup>
<i>Klebsiella</i> sp. JAc 921 A	26.348 <sup>b</sup>	22.726 <sup>bc</sup>
<i>Klebsiella</i> sp. JAc 951 A	25.06 <sup>bc</sup>	22.833 <sup>bc</sup>

BNT = 5.2262,  $\alpha = 0.05$   
 Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata

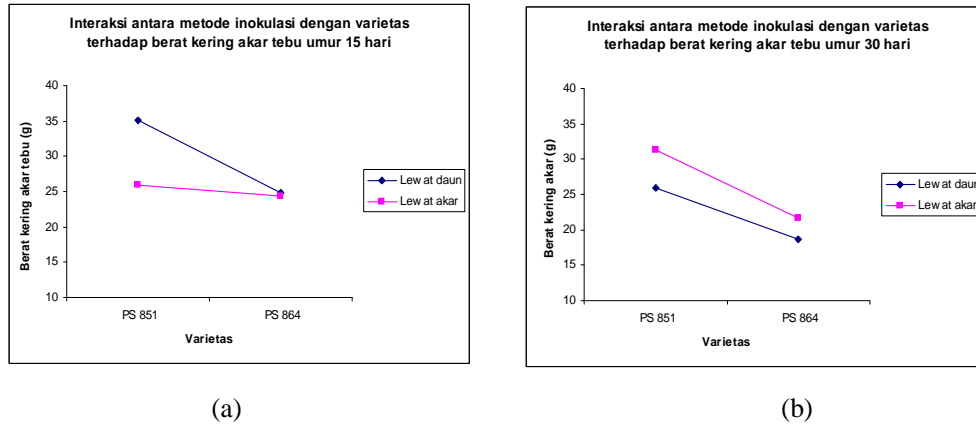
Table 8. Pengaruh waktu inokulasi dan metode aplikasi terhadap berat kering akar varietas PS 851 dan PS 864 (g)

Varietas	Metode	waktu inokulasi	
		15	30
PS 851	Lewat daun	35.183 <sup>a</sup>	25.911 <sup>b</sup>
	Lewat akar	25.975 <sup>b</sup>	31.267 <sup>a</sup>
PS 864	Lewat daun	24.823 <sup>b</sup>	18.717 <sup>c</sup>
	Lewat akar	24.373 <sup>b</sup>	21.675 <sup>bc</sup>

BNT = 4.6744,  $\alpha = 0.05$   
 Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata



Gambar 9. Interaksi antara jenis bakteri dengan varietas terhadap berat kering akar tebu

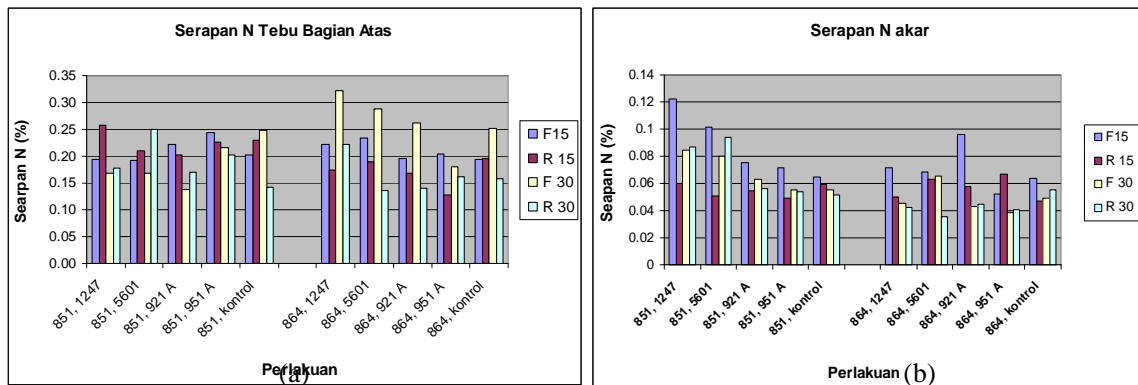


Gambar 10. Interaksi antara metode inokulasi dengan varietas bakteri pada tebu umur (a) 15 hari dan (b) 30 hari

## 5. Analisis Serapan N, P, dan K jaringan

### 5.1. Serapan N

Serapan hara N jaringan dilakukan untuk mengetahui kecukupan hara tebu, terutama dalam jaringan daun karena daun merupakan tempat deposit N utama (Van Dillewijn, 1952). Serapan N pada tebu bagian atas disajikan pada Gambar 11a. sedangkan serapan N akar tebu disajikan pada Gambar 11b.



Gambar 11. Rerata serapan N tebu (a) bagian atas (b) akar

Rata-rata serapan N tebu bagian atas varietas PS 851 dan PS 864 adalah sama besar yaitu 0.2 % per g berat kering. Sedangkan untuk serapan N akar, varietas PS 851 lebih tinggi dibanding varietas PS 864 dengan rata-rata serapan 0.05-0.07 % per g berat kering jaringan. Menurut Oliveira *et al.* (2003), perbedaan kandungan N pada akar dan jaringan bagian atas tebu ini disebabkan oleh perbedaan manajemen N oleh tanaman itu sendiri atau karena perbedaan tahap perkembangan jaringan.

Anderson & Bowen (1990) menyatakan bahwa nilai kritis serapan N daun tebu agar memberikan hasil yang optimum berkisar antara 1.0-2.05 % per g berat kering. Tebu varietas PS 851 diketahui membutuhkan asupan hara dari pupuk kimiawi dalam jumlah besar, terutama hara N (Anonim, 1998). Pengurangan dosis pupuk kimiawi (50%) kemungkinan mempengaruhi serapan N jaringan dan memberikan hasil yang kurang baik. Namun pemberian bakteri endofit yang dilakukan memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap serapan N jaringan bagian atas tebu, yaitu ditunjukkan oleh serapan N yang lebih besar dari kontrol.

Tebu varietas PS 851 yang diinokulasi dengan *Klebsiella* sp. JAc 951 A menunjukkan serapan hara N yang tertinggi dibandingkan perlakuan lain, walaupun secara statistik tidak nyata. Selain *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, kemungkinan *Klebsiella* sp. JAc 951 A juga mempunyai

kesesuaian yang baik dengan varietas PS 851. Data sebelumnya mendukung dugaan kesesuaian tersebut. Berbeda dengan *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> yang sesuai untuk varietas PS 851 maupun PS 864, *Klebsiella* sp. JAc 951 A kemungkinan hanya sesuai dengan varietas PS 851.

Perbedaan waktu inokulasi tidak berpengaruh terhadap serapan N tebu bagian atas varietas PS 864 (Tabel 9.). Interaksi ini disajikan pada Gambar 12. Kemungkinan usia tebu 15 hari untuk PS 851 adalah tahap perkembangan yang paling tepat untuk inokulasi dan berperan dalam BNF tebu. Rosenblueth & Martinez-Romero (2006) menyatakan bahwa aktivitas suatu jenis bakteri endofit sangat tergantung pada tahap perkembangan inang.

Aplikasi bakteri pada varietas PS 864 melalui daun nyata lebih baik dari pada melalui akar, tapi tidak untuk varietas PS 851 (Tabel 10.). Interaksi antara metode inokulasi dan varietas tebu ini disajikan pada Gambar 13. Metode aplikasi melalui daun memungkinkan bakteri lebih cepat masuk dalam daun yang merupakan pusat fotosintesis sehingga pertukaran N menjadi lebih efisien. Pada serapan N akar tebu, keempat variabel saling berinteraksi dan menunjukkan bahwa serapan N akar PS 851 yang diinokulasi dengan *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> melalui daun pada umur 15 hari adalah yang tertinggi diantara semua perlakuan (Tabel 11.).

Table 9. Pengaruh waktu aplikasi terhadap serapan N tebu bagian atas varietas PS 851 dan PS 864 (%)

Varietas	Waktu inokulasi	
	15 hari	30 hari
PS 851	0.217 a	0.1877 b
PS 864	0.192 ab	0.2127 ab

BNT = 0.0281,  $\alpha = 0.05$

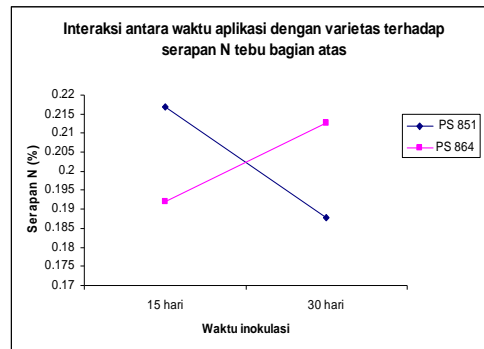
Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata

Table 10. Pengaruh metode inokulasi terhadap serapan N tebu varietas PS 851 dan PS 864 bagian atas (%)

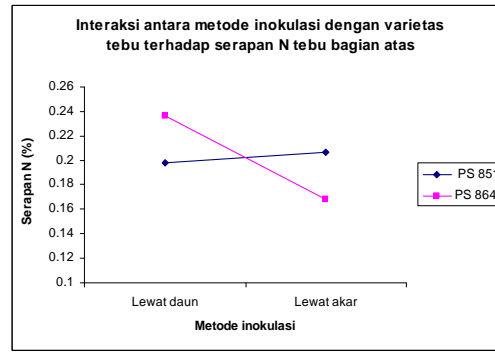
Varietas	Metode	
	Lewat daun	Lewat akar
PS 851	0.1977 b	0.207 b
PS 864	0.2367 a	0.168 c

BNT = 0.0281,  $\alpha = 0.05$

Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata



Gambar 12. Interaksi antara waktu aplikasi dengan varietas terhadap serapan N tebu bagian atas



Gambar 13. Interaksi antara metode inoculasi dengan varietas tebu terhadap serapan N tebu bagian atas

Table 11. Pengaruh jenis bakteri, metode, dan waktu aplikasi terhadap serapan N akar tebu (%)

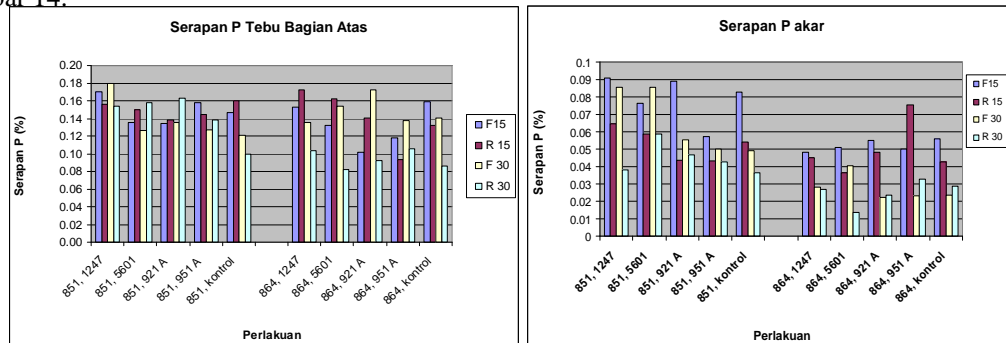
Varietas	Bakteri	15		30	
		Lewat daun	Lewat daun	Lewat daun	Lewat daun
PS 851	Kontrol	0.0633 <sup>bc</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	0.0567 <sup>bc</sup>	0.0467 <sup>c</sup>
	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.0867 <sup>b</sup>
	<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	0.1 <sup>ab</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.0933 <sup>ab</sup>
	<i>Klebsiella</i> sp. JAC 921 A	0.0733 <sup>b</sup>	0.0567 <sup>bc</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	0.0567 <sup>bc</sup>
	<i>Klebsiella</i> sp. JAC 951 A	0.0733 <sup>b</sup>	0.0533 <sup>bc</sup>	0.0567 <sup>bc</sup>	0.0533 <sup>bc</sup>
PS 864	Kontrol	0.06 <sup>bc</sup>	0.0467 <sup>c</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.0533 <sup>bc</sup>
	<i>A. lipoferum</i> JCM 1247 <sup>T</sup>	0.07 <sup>bc</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.0467 <sup>c</sup>	0.0433 <sup>cd</sup>
	<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601 <sup>T</sup>	0.07 <sup>bc</sup>	0.0633 <sup>bc</sup>	0.0633 <sup>bc</sup>	0.0367 <sup>d</sup>
	JAC 921 A	0.0933 <sup>ab</sup>	0.0567 <sup>bc</sup>	0.04 <sup>cd</sup>	0.0433 <sup>cd</sup>
	JAC 951 A	0.05 <sup>c</sup>	0.0667 <sup>bc</sup>	0.0367 <sup>cd</sup>	0.04 <sup>cd</sup>

BNT = 0.0296,  $\alpha = 0.05$

Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata

### 5.2. Serapan P Jaringan

Selain nitrogen, fosfat merupakan unsur vital bagi pertumbuhan tanaman. P dibutuhkan dalam setiap reaksi metabolisme (sumber energi berupa ATP dan ADP), sebagai komponen asam nukleat dan fosfolipid (Anderson & Bowen, 1990) sehingga P merupakan salah satu parameter keberhasilan inoculasi bakteri. Hasil pengukuran serapan hara P dalam jaringan disajikan pada Gambar 14.



(a)

(b)

Gambar 14. Rerata serapan P tebu (a) bagian atas (b) akar

Pengukuran terhadap serapan P menunjukkan bahwa serapan P tebu bagian atas berkisar antara 0.11-0.17 % dan serapan P akar berkisar antara 0.04-0.09 % per g berat kering jaringan. Menurut Anderson & Bowen (1990), nilai kritis serapan P daun tebu agar memberikan hasil yang optimum berkisar antara 0.1-0.22 % per g berat kering sehingga dari hasil tersebut diketahui bahwa nilai kritis unsur P telah terpenuhi. Hara P tebu didapatkan dari tanah dan pemberian pupuk P kimiawi pada dosis optimal (100%) telah cukup memenuhi kebutuhan P tebu.

Tidak ada perbedaan serapan P pada PS 851 dan PS 864. Serapan hara P perlakuan yang lebih besar dari kontrol kemungkinan lebih disebabkan oleh peningkatan kemampuan tebu untuk menyerap unsur hara dan mineral tanah. Untuk serapan P akar tebu varietas PS 851, jenis bakteri berpengaruh nyata terhadap serapan hara karena faktor kesesuaian bakteri dengan varietas (Tabel 13.). Untuk interaksinya, disajikan pada Gambar 16.

Pengaruh metode dan waktu aplikasi terhadap kedua varietas tebu yang digunakan disajikan pada Tabel 12. dan interaksinya disajikan pada Gambar 15. Dari tabel tersebut diketahui bahwa tidak ada perlakuan yang memberikan pengaruh nyata terhadap serapan P tebu bagian atas. Aplikasi melalui daun memang menunjukkan serapan P yang lebih besar dari pada melalui akar tetapi perbedaan tersebut tidak signifikan. Demikian juga dengan waktu inokulasi (Tabel 14.). Interaksi varietas-waktu aplikasi menunjukkan bahwa aplikasi pada PS 851 lebih baik jika dilakukan pada umur 15 hari (Gambar 17.).

Table 12. Pengaruh metode dan waktu aplikasi terhadap serapan P tebu bagian atas varietas PS 851 dan PS 864 (%)

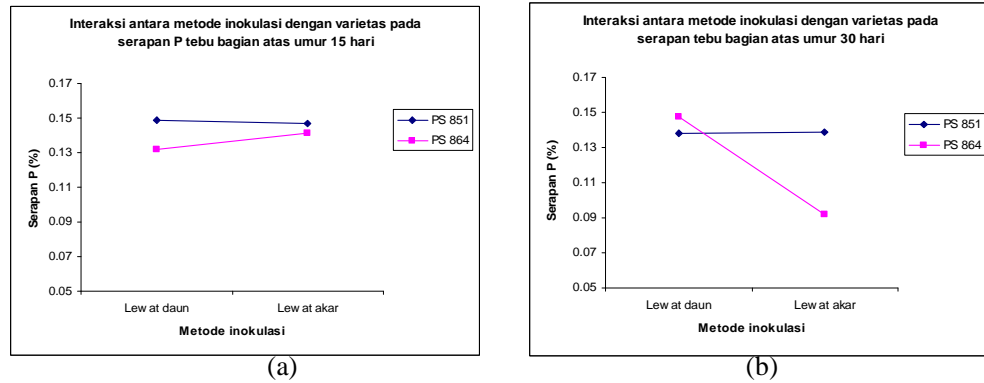
Varietas	Metode	waktu inokulasi	
		15	30
PS 851	Lewat daun	0.1487 <sup>a</sup>	0.138 <sup>a</sup>
	Lewat akar	0.1467 <sup>a</sup>	0.1387 <sup>a</sup>
PS 864	Lewat daun	0.132 <sup>a</sup>	0.1473 <sup>a</sup>
	Lewat akar	0.1413 <sup>a</sup>	0.092 <sup>b</sup>
BNT = 0.0253, $\alpha = 0.05$ Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata			

Table 13. Pengaruh jenis bakteri terhadap serapan P akar tebu varietas PS 851 dan PS 864 (%)

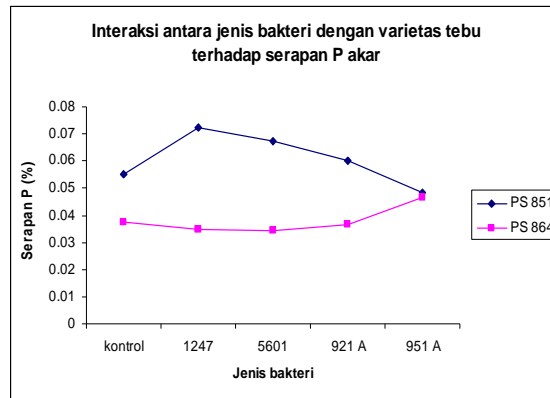
bakteri	Varietas	
	PS 851	PS 864
kontrol	0.055 <sup>b</sup>	0.0375 <sup>c</sup>
1247	0.0725 <sup>a</sup>	0.035 <sup>c</sup>
5601	0.0675 <sup>ab</sup>	0.0342 <sup>c</sup>
921 A	0.06 <sup>ab</sup>	0.0367 <sup>c</sup>
951 A	0.0483 <sup>bc</sup>	0.0467 <sup>bc</sup>
BNT = 0.0149, $\alpha = 0.05$ Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata		

Table 14. Pengaruh waktu aplikasi terhadap serapan P akar tebu varietas PS 851 dan PS 864 (%)

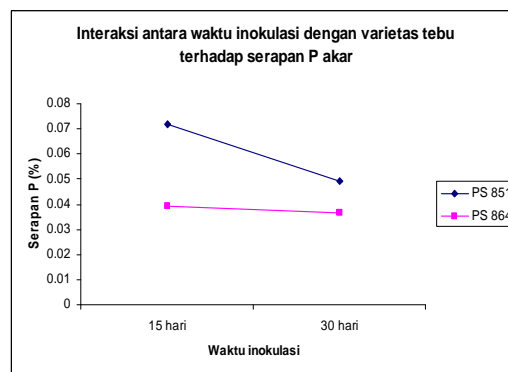
varietas	Metode	
	15 hari	30 hari
PS 851	0.072 <sup>a</sup>	0.0493 <sup>b</sup>
PS 864	0.0393 <sup>c</sup>	0.0367 <sup>c</sup>
BNT = 0.0094, $\alpha = 0.05$ Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata		



Gambar 15. Interaksi antara metode inokulasi dengan varietas pada serapan tebu bagian atas umur (a) 15 hari dan (b) 30 hari



Gambar 16.a. Interaksi antara jenis bakteri dengan varietas tebu terhadap serapan P akar

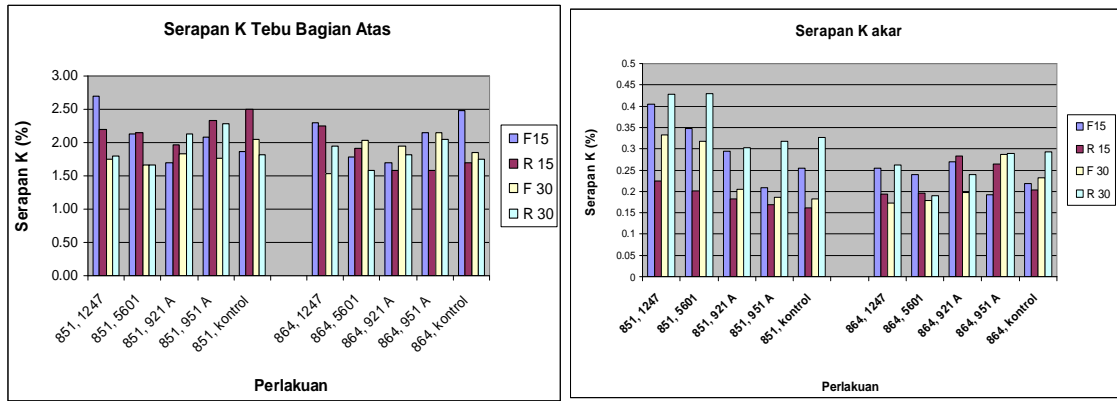


Gambar 17. Interaksi antara waktu aplikasi dengan varietas tebu terhadap serapan P akar



### 5.3. Serapan K Jaringan

K merupakan unsur penting untuk transpor proton tebu. Kekurangan K dapat menurunkan hasil tebu dan dapat menyebabkan tebu mudah roboh (Anderson & Bowen, 1990). Hasil analisis serapan K tebu disajikan pada Gambar 18.



(a) (b)  
Gambar 18. Rerata serapan K tebu (a) bagian atas (b) akar

Analisis terhadap kandungan K tebu bagian atas menunjukkan bahwa serapan K tebu berkisar antara 1.7-2.1 % per g berat kering dan untuk akar sekitar 0,05-0,09%. Menurut Anderson & Bowen (1990), nilai kritis serapan K daun tebu agar memberikan hasil yang optimum berkisar antara 0.2-1.2% per g berat kering. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa kebutuhan hara K telah terpenuhi oleh pemberian pupuk kimiawi yang diberikan pada dosis optimal (100%).

Rata-rata serapan K pada tebu bagian atas tertinggi ditunjukkan oleh varietas PS 851, terutama pada tebu yang diinokulasi dengan *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>. Demikian juga untuk serapan K tebu akar. Serapan K tebu bagian atas tertinggi ditunjukkan oleh inokulan *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> pada inokulasi umur 15 hari dan *Klebsiella* sp. JAc 951 A pada umur 30 hari. Secara statistik hasil tersebut signifikan (Tabel 15.) dan interaksinya disajikan pada Gambar 19. Serapan K tebu bagian atas menunjukkan bahwa metode aplikasi melalui daun menghasilkan efek lebih baik, tetapi serapan K akar (Tabel 16.) menunjukkan bahwa metode aplikasi melalui akar menghasilkan efek lebih baik dan umur tebu yang tepat untuk inokulasi adalah pada saat umur 30 hari karena adanya interaksi yang kompleks antara bakteri dengan tebu. Interaksi antara metode dan waktu aplikasi ini disajikan pada Gambar 20.

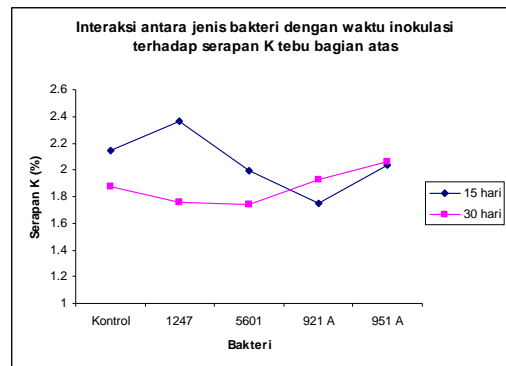
Table 15. Pengaruh jenis bakteri dan waktu aplikasi terhadap serapan K tebu bagian atas (%)

Bakteri	waktu inokulasi	
	15 hari	30 hari
Kontrol	2.1425 ab	1.8775 bc
1247	2.3617 a	1.7558 c
5601	1.9933 abc	1.7408 c
921 A	1.7483 c	1.93 bc
951 A	2.0342 abc	2.0625 abc
BNT = 0.3784, $\alpha = 0.05$		
Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata		

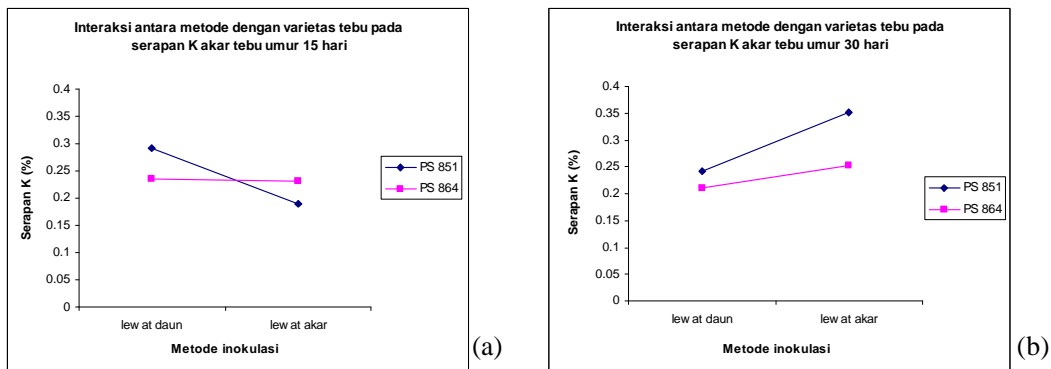
Tabel 16. Pengaruh metode dan waktu aplikasi bakteri terhadap serapan K akar varietas PS 851 dan PS 864 (%)

Varietas	metode	waktu inokulasi	
		15	30
PS 851	Lewat daun	0.292 <sup>b</sup>	0.2413 <sup>c</sup>
	Lewat akar	0.1887 <sup>d</sup>	0.3507 <sup>a</sup>
PS 864	Lewat daun	0.2353 <sup>c</sup>	0.2107 <sup>cd</sup>
	Lewat akar	0.2313 <sup>cd</sup>	0.2533 <sup>bc</sup>

BNT = 0.0444,  $\alpha = 0.05$   
 Hasil yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata



Gambar 19. Interaksi antara jenis bakteri dengan waktu inokulasi terhadap serapan tebu bagian atas



Gambar 20. Interaksi antara metode inokulasi dengan varietas pada serapan K akar tebu umur (a) 15 hari dan (b) 30 hari

Percobaan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor kesesuaian antara varietas tebu dengan bakteri uji sangat berpengaruh terhadap aktivitas bakteri dalam jaringan dan respon tebu yang dapat dianalisis melalui karakter-karakter agronomi dan serapan hara N, P, K. Metode aplikasi terbukti tidak memberikan pengaruh yang cukup signifikan terhadap jumlah bakteri yang dapat masuk ke dalam tebu. Jumlah bakteri yang banyak dalam jaringan belum tentu memberikan efek yang paling baik bagi tebu karena adanya berbagai mekanisme dan interaksi antara bakteri-tebu dan bakteri inokulan-residen yang secara alami membatasi diri sehingga jumlahnya tetap *equilibrium* dan tidak menimbulkan efek patogenik bagi tebu. Selain itu, aplikasi bakteri endofit diazotrof pada umur 15 maupun 30 hari tidak berpengaruh signifikan terhadap efektivitas bakteri endofit diazotrof terhadap tebu sehingga aplikasi dapat dilakukan baik pada tebu umur 15 maupun 30 hari.

## KESIMPULAN

Penelitian terhadap bakteri endofit diazotrof dengan kode *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup>, *G. diazotrophicus* DSM 5601<sup>T</sup>, *Klebsiella* sp. JAc 951 A, dan *Klebsiella* sp. JAc 921 A menunjukkan bahwa semua isolat bakteri tersebut mempunyai aktifitas penambatan nitrogen yang menguntungkan bagi tebu. Dari keempat isolat bakteri yang digunakan, bakteri *A. lipoferum* JCM 1247<sup>T</sup> adalah isolat yang paling sesuai dengan PS 851 dan PS 864, sedangkan bakteri *Klebsiella* sp. JAc 951 cukup sesuai pada PS 851. Namun secara keseluruhan, respon PS 851 terhadap inokulasi bakteri lebih baik dari PS 864.

Keempat jenis bakteri tersebut dapat masuk dalam tebu baik melalui daun maupun akar. Metode aplikasi tidak berpengaruh terhadap jumlah bakteri yang dapat masuk ke dalam tebu. Aplikasi tersebut dapat dilakukan pada saat tebu berumur 15 maupun 30 hari. Aplikasi pada umur 15 hari tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan aplikasi pada umur 30 hari.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1998. *Deskripsi Varietas PS 851 dan PS 864*. P3GI. Pasuruan
- Anderson, D. L. & J. E. Bowen. 1990. *Sugarcane Nutrition*. Potash and Phosphate Institute, Atlanta. pp: 24-26
- Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi, & J. Dobereiner. 1997. Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation Association with Non-Legume *Plant & Soil Biology Biochemistry*. **29** : 911 – 922
- Boddey, R. M., S. Urquiaga, B. J. R. Alves, & V. Reis. 2003. Endophytic Nitrogen Fixation in Sugarcane : Present Knowledge and Future Application. *Plant & Soil*. **257** : 169 – 147
- Boddey, R. M., S. Urquiaga, V. Reis, & J. Dobereiner. 1991. Biological Nitrogen fixation Associated with Sugarcane. *Nitrogen Fixation*. pp: 105-111
- Caballero-Mellado, J., E. Martinez-Romero. 1994. Limited Genetic Diversity in the Endophytic Sugarcane Bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied & Environmental Microbiology*. **60** (5) : 1532-1537
- Di Fiero, S. & M. Del Gallo. 1995. Endophytic Bacteria : Their Possible Role in Host Plant. In *NATO ASI Series, Vol G37 : Azospirillum and Related Microorganism* (Ed. I. Fedrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, & M. de Zmaroczy). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin. pp : 169 – 184
- Dong, Z., A. L. Iniguez, & E. W. Triplett. 2003. Quantitive Assesment of The Host Range and Strain Specificity of Endophytic Colonization by *Klebsiella pneumoniae* Kp342. *Plant & Soil*. **257** : 49 – 59
- Germaine, K. J., X. Liu, G. G. Cabellos, J. P. Hogan, D. Ryan & D. N. Dowling. 2006. Bacterial Endophyte Enhanced Phytoremediation of the Organochlorine Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Federation of European Microbiological Societies Microbial Ecology*. **57** : 302–310
- Mirza, M. S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, & K. A. Malik. 2001. Isolation, Partial Characterization, and The Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) on Micropropagated Sugarcane in Vitro. *Plant & Soil*. **273** : 47-54
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, S. Seshadri & C. Lakshminarasimhan. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*. **83** (2) : 137-146
- Oliveira A.L.M., Urquiaga S., Dobereiner J. and Baldani J.I. 2002. The Effect of Inoculating Endophytic N<sub>2</sub>-fixing Bacteria on Micropropagated Sugarcane Plants. *Plant & Soil*. **242**: 205–215

- Rao, N. S. S. 1999. *Soil Microbiology : 4<sup>th</sup> ed of Soil Microorganism & Plant Growth*. Science Publisher, Plymouth. pp : 124-136
- Reis, V. M., F. Olivares, J. Dobereiner. 1994. Improve Methodology fot Isolation of *A. diazotrophicus* and Confirmation of its Endophytic Habitat. *World Journal of Applied Microbiology*. **40** : 401-405
- Rennie, R. J., J. R. de Frietas, A. P. Ruschel, & P. B. Vose. 1982. Inoculation and Identification of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with Sugarcane (*Saccharum* sp.). *Cannadian Journal of Microbiology*. **28** : 462-467
- Rosenblueth, M. & E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. **19** (8) : 827-837
- Saklani, P., A. Sharma, & M. Singh. 2006. Possitive Effect of Cultivation of Endodiazotroph on Growth Characteristic of Sugarcane. *International. Symposium on Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Country, Guilin, China*. pp : 189 – 194
- Saravanan, V. S. M. Madhaiyan, Jabez Osborne, M. Thangaraju & T.M. Sa. 2007. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology*. **57** : 89-96
- Shankaraiah. 2006. Effect of Nitrogen Management Through Biological Process on Nitrogen Use Efficiency in Sugarcane and Environmental Protection. *International. Symposium on Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Country, Guilin, China*. pp : 91-95
- Suman, A., A. Gaur, Shrivasta & R. L. Yadav. 2005. Improving Sugarcane Growth and Nutrient Uptake by Inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Plant Growth Regulation*. **47** : 155-162
- Susianawati, N., W. E. Widayati, L. Sembiring. 2008. Aplikasi Pupuk N anorganik terhadap Stabilitas Bakteri Endofit Diazotrof dalam Jaringan Tebu (*Saccharum officinarum*). Thesis. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Van Dillewijn, C. 1952. *Botany of Sugarcane*. Waltham Pub. pp : 23-56
- Widayati, W. E. 1996. Study on The Occurrence of Diazotrophic Bacteria in The Sugarcane Stalks Tebu. *Bulletin*. **143** : 1-10