

# OPTIMASI TEKNOLOGI FERMENTASI UNTUK PRODUKSI BAKTERI ENDOFIT SEBAGAI PUPUK HAYATI

Ali Ikhwan<sup>1)</sup> dan Saefurrohman<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Dosen Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian – Peternakan  
Universitas Muhammadiyah Malang  
Email : aliikhwan64@gmail.com

<sup>2)</sup>Mahasiswa Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian – Peternakan  
Universitas Muhammadiyah Malang  
Alamat: Jl. Raya Tlogomas No. 246 Kota Malang

## ABSTRACT

*Ten isolates of endophytes bacteria have been tested as biofertilizer due to their ability to synthesize growth hormone IAA and fixate nitrogen. They are intended to be produced on industrial scale using fermentation principle. This research aim to discover pH and temperature combination that yield the best fermentation result. Three of ten isolates (IM1, IM10 and IM25) were inoculated in fermentor on M63 medium at combination of three pH levels (6.0, 6.5 and 7.0) and three temperature levels (28, 32 and 36 °C) of nine total combinations using randomly complete factorial design. Fermentation is carried out for 18 hours at each combination. Samples are taken every two hours which absorbances are measured using spectrophotometer at  $\lambda$  420 nm. Optical Densities (OD) are analyzed using quadratic regression, analysis of variance along with Tukey's HSD test ( $\alpha= 5\%$ ) and principal component analysis to discover the best combination. The result showed that combination of pH 7.0 and temperature 32 °C as the best combination. OD maximum is obtained at 1.852 using quadratic regression method. As for principal component analysis, this combination produces highest score of 5.188 on behalf of two components of PC1 and PC2 with 86.97% cumulative variability.*

**Keyword** : fermentation, endophyte bacteria, biofertilizer, pH, temperature

## 1. PENDAHULUAN

Bakteri endofit lazim ditemukan hidup bersimbiosis di dalam jaringan tanaman. Hubungan simbiosis antara keduanya – endofit dan tanaman inang – sangat beragam. Namun secara umum dapat dikelompokkan dalam dua kategori, yaitu simbiosis yang menguntungkan dan merugikan (Hallman, 1997). Beberapa jenis endofit diketahui memberikan manfaat bagi tanaman inang seperti menstimulasi pertumbuhan tanaman melalui sintesis berbagai ZPT, memfiksasi N<sub>2</sub> (Susilo, 2015), melarutkan Fosfat (Young, dkk., 2013), mensintesis *Siderophore* (Loaces, dkk., 2011) dan meningkatkan resistensi tanaman terhadap patogen (Taghavi, dkk., 2010). Kemampuan-kemampuan tersebut menjadikan bakteri endofit potensial untuk dijadikan pupuk hayati (*biofertilizer*).

Sepuluh isolat bakteri endofit yang diisolasi dari perakaran tanaman Padi (*Oryza sativa*) diketahui memiliki potensi untuk memfiksasi N<sub>2</sub> dan mensintesis berbagai metabolit sekunder seperti *Niacin*, *Pyridoxine*, IBA, IAA, Kinetin, GA<sub>3</sub> dan GA<sub>1</sub> pada berbagai tingkat yang berbeda (Susilo, 2015). Selanjutnya pada isolat-isolat tersebut berhasil disisipkan gen *Green Flourescent Protein* (GFP) yang berfungsi sebagai penanda (*marker*) dengan disertai perubahan resistensi terhadap antibiotik (Khair,

2017). Sepuluh isolat bakteri tersebut memiliki potensi untuk diproduksi secara massal sebagai pupuk hayati. Perbanyakkan isolat bakteri skala laboratorium dinilai tidak efisien untuk memenuhi tuntutan volume produksi yang tinggi. Sehingga dibutuhkan pengembangan teknologi produksi isolat bakteri tersebut pada skala industri menggunakan fermentor sebagai bioreaktor.

Teknologi produksi isolat bakteri pada skala industri dilakukan berdasarkan prinsip fermentasi (Stanbury, dkk., 1995). Namun, guna memperoleh hasil fermentasi yang optimal perlu dicari kombinasi pH dan suhu yang tepat. Hal ini dikarenakan pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh lingkungannya terutama pH dan suhu (Hogg, 2006). Penelitian ini dilakukan dalam rangka mencari kombinasi pH dan suhu terbaik untuk fermentasi produksi bakteri endofit sebagai pupuk hayati.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Alat dan Bahan

Penelitian menggunakan alat-alat berikut yakni satu set fermentor BIOTRON, spektrofotometer, *laminar air flow*, *autoclave*, neraca analitik, *oven*, *refrigerator*, *microwave*, *bunsen burner*, *waterbath*, alat-alat kaca, mikropipet dan *tubeependorf*. Sedangkan bahan yang digunakan adalah media LB (padat dan cair), media M63, tiga isolat bakteri endofit biofertilizer (IM1, IM10 dan IM25), garam fisiologis, alkohol 70%, HCl dan NaOH (1 N).

Media LB (padat dan cair) digunakan untuk meremajakan isolat dibuat sebagaimana dijelaskan Atlas (2010), dimana per 1000 ml media dibutuhkan tripton 10 g, *yeast extract* 5 g, NaCl 5 g, (untuk media LB padat ditambah agar 15 g) lalu ditambahkan aquadest hingga 1000 ml. Bahan-bahan tersebut lalu dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Sedangkan media M63 digunakan sebagai media fermentasi per 1000 ml membutuhkan bahan yakni  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.608 g, KOH 4.208 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  13.201 g,  $\text{MgSO}_4$  0.039 g,  $\text{FeSO}_4$  0.001 g, Glukosa 1.802 g lalu ditambah aquadest hingga 1000 ml. Media LB dan M63 selanjutnya disterilisasi pada 121 °C selama 15 menit.

### 2.2 Langkah Kerja

Penelitian dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama adalah peremajaan stok bakteri. Masing-masing isolat diremajakan menggunakan metode *spread plate* dan dimurnikan dengan metode *streak plate* keduanya pada media LB padat. Selanjutnya bakteri di-*shaker* pada media LB cair dan dilanjutkan pada media M63 masing-masing selama 24 jam. Isolat lalu disimpan di refrigerator untuk digunakan kemudian sebagai *starter*.

Tahap kedua adalah proses fermentasi menggunakan fermentor. Masing-masing isolat diencerkan menggunakan garam fisiologis hingga diperoleh OD 0.100. Selanjutnya diambil masing-masing

sebanyak 30 ml dari tiga isolat sehingga diperoleh total 90 ml starter isolat bakteri. Starter diinokulasikan pada media 2 l media M63 yang telah diatur pada pH dan suhu yang diinginkan pada Tabel 1.

Fermentasi dilakukan hingga fase stasioner pada 18 jam. Pengambilan sampel dilakukan tiap 2 jam sekali lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  420 nm guna memperoleh nilai OD (Susilo, 2015).

### 2.3 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Jumlah faktor perlakuan ada dua yaitu pH dan suhu fermentasi dengan tiga kali ulangan. pH diatur pada tiga taraf yaitu pH 6.0 , 6.5 dan 7.0 sedangkan suhu diatur pada tiga level yaitu 28, 32 dan 36 °C. Faktor perlakuan merupakan pengaturan (*setting*) pada fermentor dimana pH dan suhu media diatur agar konstan sebagaimana yang dikehendaki selama fermentasi berlangsung. Total perlakuan yang diperoleh setelah kedua faktor dikombinasikan berjumlah 9 perlakuan sebagaimana diuraikan pada Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Penelitian

Faktor	P <sub>1</sub> (pH 6.0)	P <sub>2</sub> (pH 6.5)	P <sub>3</sub> (pH 7.0)
T <sub>1</sub> (suhu 28 °C)	P <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	P <sub>3</sub> T <sub>1</sub>
T <sub>2</sub> (suhu 32 °C)	P <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>2</sub>	P <sub>3</sub> T <sub>2</sub>
T <sub>3</sub> (suhu 36 °C)	P <sub>1</sub> T <sub>3</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	P <sub>3</sub> T <sub>3</sub>

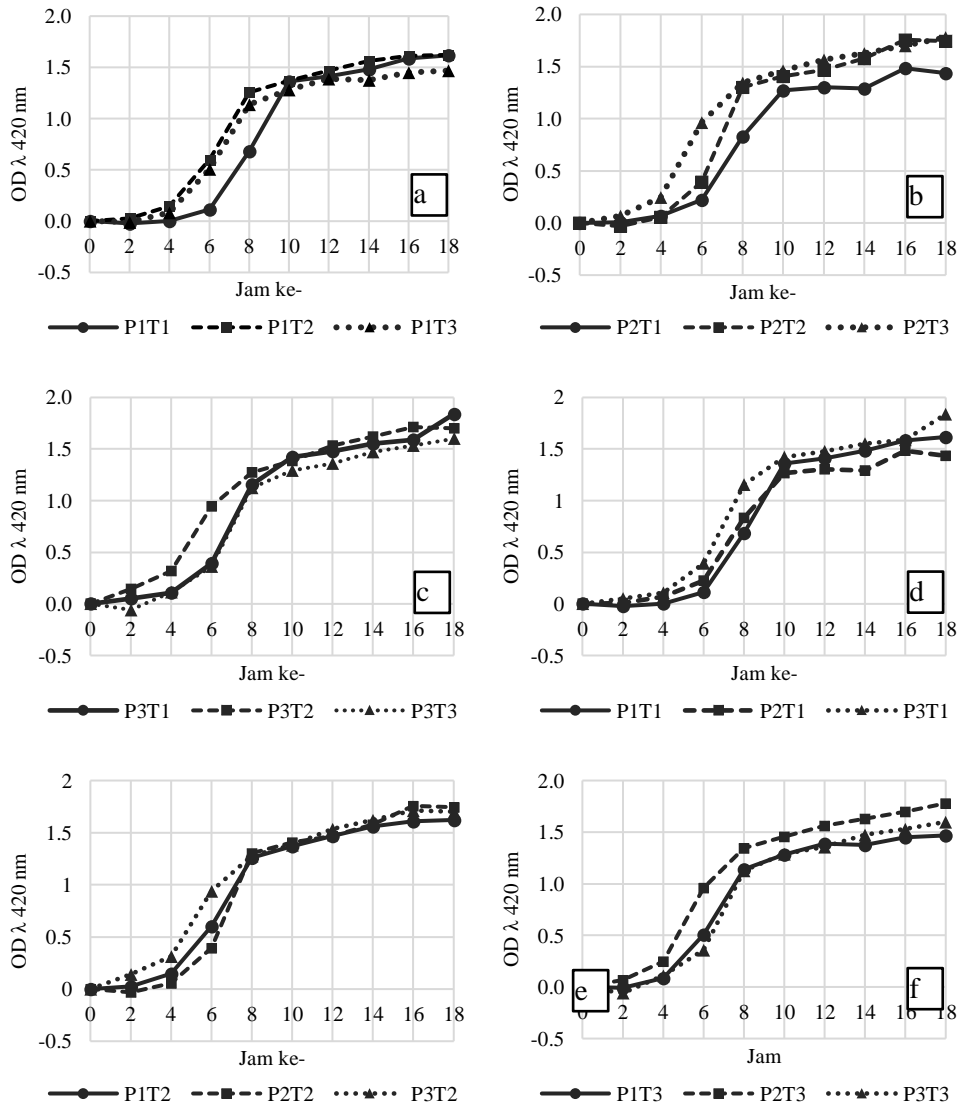
Data OD bakteri yang diperoleh lalu diplot ke dalam grafik guna memperoleh kurva pertumbuhan bakteri. Selanjutnya data tersebut dianalisis secara kuantitatif menggunakan tiga metode analisis. Pertama, analisis secara regresi kuadratik dengan asumsi bahwa kurva pertumbuhan mengikuti model persamaan kuadratik. Tujuannya untuk memperoleh titik puncak kurva ( $Y_{maks}$ ). Kedua, analisis secara statistik menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji BNJ pada taraf 5%. Tujuannya untuk menguji pengaruh perlakuan dan mencari perlakuan terbaik. Ketiga, menggunakan analisis komponen utama (PCA) yang memiliki tujuan sama yaitu mencari mana perlakuan terbaik yang memberikan produksi bakteri paling optimum.

Perangkat lunak yang digunakan untuk menganalisis data adalah Microsoft Excel versi 2016. Adapun prosedur analisis komponen utama dilakukan menggunakan perangkat lunak XLSTAT yang merupakan *add-on* yang terintegrasi dengan Microsoft Excel.

## 3.HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri

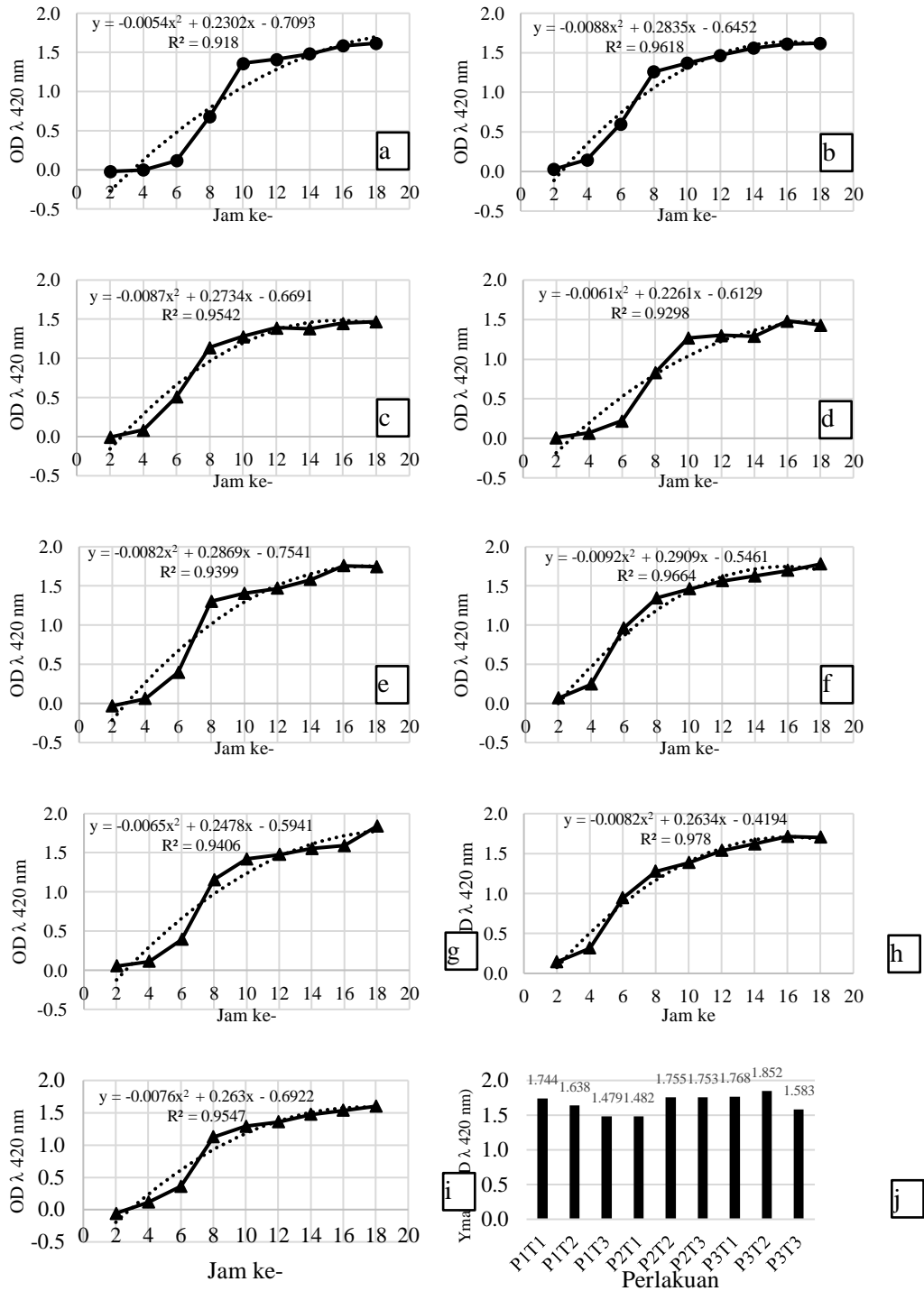
Kurva pertumbuhan bakteri dikelompokkan berdasarkan ; pertama, pH sama pada suhu berbeda; dan kedua, pH berbeda pada suhu yang sama. Tujuannya untuk melihat kecenderungan kurva pertumbuhan berdasarkan naiknya pH atau suhu sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1 di bawah ini :



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri pada (a) pH 6.0 dan suhu 28, 32, 36 °C, (b) pH 6.5 dan suhu 28, 32, 36 °C, (c) pH 7.0 dan suhu 28, 32, 36 °C, (d) pH 6.0, 6.5 dan 7.0, suhu 28°C, (e) pH 6.0, 6.5 dan 7.0, suhu 32°C, (f) pH 6.0, 6.5 dan 7.0, suhu 36°C.

### 3.2 Regresi Kuadrat

Regresi kuadrat pada kurva-kurva pertumbuhan bakteri selama fermentasi ditunjukkan pada Gambar 2 di bawah ini :



Gambar 2. Regresi kuadratik kurva pertumbuhan pada (a) pH 6.0, 28°C (P<sub>1</sub>T<sub>1</sub>), (b) pH 6.0, 32°C (P<sub>1</sub>T<sub>2</sub>), (c) pH 6.0, 36°C (P<sub>1</sub>T<sub>3</sub>), (d) pH 6.5, 28°C (P<sub>2</sub>T<sub>1</sub>), (e) pH 6.5, 32°C (P<sub>2</sub>T<sub>2</sub>) (f) pH 6.5, 36°C (P<sub>2</sub>T<sub>3</sub>), (g), pH 7.0, 28°C (P<sub>3</sub>T<sub>1</sub>), (h) pH 7.0, 32°C (P<sub>3</sub>T<sub>2</sub>), (i) pH 7.0, 36°C (P<sub>3</sub>T<sub>3</sub>) dan (j) grafik perbandingan y<sub>max</sub> pada berbagai kombinasi perlakuan.

### 3.3 Sidik Ragam dan Uji BNJ

Tabel 2. Hasil Pengukuran OD Sampel pada jam ke-2 s.d. jam ke-18

Perlakuan	OD ( $\lambda$ 420 nm) pada Jam ke-									
	2 jam		4 jam		6 jam		8 jam		10 jam	
P <sub>1</sub> T <sub>1</sub> (pH 6.0, 28 °C)	-0.022	ab	0.000	a	0.115	a	0.682	a	1.360	ab
P <sub>1</sub> T <sub>2</sub> (pH 6.0, 32 °C)	0.029	bcd	0.148	c	0.602	c	1.259	de	1.369	ab
P <sub>1</sub> T <sub>3</sub> (pH 6.0, 36 °C)	-0.008	abc	0.086	abc	0.508	bc	1.140	c	1.280	a
P <sub>2</sub> T <sub>1</sub> (pH 6.5, 28 °C)	0.009	abcd	0.069	abc	0.222	ab	0.830	b	1.269	ab
P <sub>2</sub> T <sub>2</sub> (pH 6.5, 32 °C)	-0.031	ab	0.058	ab	0.396	d	1.301	e	1.405	ab
P <sub>2</sub> T <sub>3</sub> (pH 6.5, 36 °C)	0.066	d	0.244	d	0.963	b	1.347	e	1.459	b
P <sub>3</sub> T <sub>1</sub> (pH 7.0, 28 °C)	0.052	cd	0.110	bc	0.392	bc	1.156	cd	1.421	ab
P <sub>3</sub> T <sub>2</sub> (pH 7.0, 32 °C)	0.143	e	0.317	d	0.943	d	1.276	e	1.384	ab
P <sub>3</sub> T <sub>3</sub> (pH 7.0, 36 °C)	-0.058	a	0.112	bc	0.359	b	1.126	c	1.291	a
BNJ 5%	0.070		0.088		0.233		0.111		0.152	

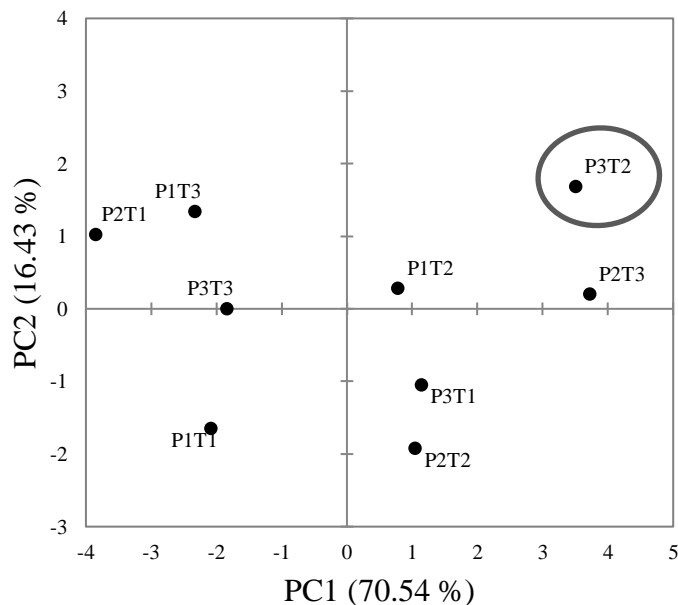
Perlakuan	OD ( $\lambda$ 420 nm) pada Jam ke-							
	12 jam		14 jam		16 jam		18 jam	
P <sub>1</sub> T <sub>1</sub> (pH 6.0, 28 °C)	1.410	bc	1.482	c	1.586	bcd	1.617	b
P <sub>1</sub> T <sub>2</sub> (pH 6.0, 32 °C)	1.469	cd	1.561	de	1.610	cde	1.622	b
P <sub>1</sub> T <sub>3</sub> (pH 6.0, 36 °C)	1.390	bc	1.378	b	1.449	a	1.468	a
P <sub>2</sub> T <sub>1</sub> (pH 6.5, 28 °C)	1.301	a	1.292	a	1.484	ab	1.434	a
P <sub>2</sub> T <sub>2</sub> (pH 6.5, 32 °C)	1.470	cd	1.577	def	1.757	f	1.743	cd
P <sub>2</sub> T <sub>3</sub> (pH 6.5, 36 °C)	1.563	e	1.627	f	1.698	def	1.780	de
P <sub>3</sub> T <sub>1</sub> (pH 7.0, 28 °C)	1.475	cd	1.554	d	1.591	bcde	1.839	e
P <sub>3</sub> T <sub>2</sub> (pH 7.0, 32 °C)	1.536	de	1.620	ef	1.713	ef	1.701	c
P <sub>3</sub> T <sub>3</sub> (pH 7.0, 36 °C)	1.357	ab	1.475	c	1.533	abc	1.600	b
BNJ 5%	0.086		0.065		0.122		0.056	

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf signifikansi 5%.

### 3.4 Analisis Komponen Utama

Tabel 39. Skor Masing-masing Perlakuan pada Komponen Utama PC1 dan PC 2.

Perlakuan	Skor pada komponen	
	PC1	PC2
P <sub>1</sub> T <sub>1</sub> (pH 6.0, suhu 28 °C)	-2.090	-1.638
P <sub>1</sub> T <sub>2</sub> (pH 6.0, suhu 32 °C)	0.772	0.288
P <sub>1</sub> T <sub>3</sub> (pH 6.0, suhu 36 °C)	-2.343	1.350
P <sub>2</sub> T <sub>1</sub> (pH 6.5, suhu 28 °C)	-3.864	1.034
P <sub>2</sub> T <sub>2</sub> (pH 6.5, suhu 32 °C)	1.039	-1.914
P <sub>2</sub> T <sub>3</sub> (pH 6.5, suhu 36 °C)	3.710	0.210
P <sub>3</sub> T <sub>1</sub> (pH 7.0, suhu 28 °C)	1.132	-1.038
P <sub>3</sub> T <sub>2</sub> (pH 7.0, suhu 32 °C)	3.493	1.695
P <sub>3</sub> T <sub>3</sub> (pH 7.0, suhu 36 °C)	-1.849	0.013



Gambar 3. Scatter plot skor tiap perlakuan pada dua komponen utama PC1 dan PC2 (*cumulative variability* 86.97%). Posisi P3T2 sebagai perlakuan dengan total skor terbaik ditandai dengan bulatan.

### 3.5 Pembahasan

Kurva pertumbuhan bakteri pada Gambar 1 sesuai sebagaimana yang diprediksi. Fase *lag* terlihat pada kurva yang landai di awal fermentasi. Pada fase tersebut bakteri mulai beradaptasi terhadap lingkungan (Madigan dkk., 2000) dengan memperbaiki berbagai makromolekul yang rusak pada fase sebelumnya (Dukan dan Nyström, 1998), serta mulai mengekspresikan berbagai gen yang mendorong pertumbuhan pada lingkungan yang baru (Rolfe dkk., 2012). Selanjutnya bakteri memasuki fase eksponensial dicirikan dengan kurva yang naik tajam. Fase tersebut berjalan hingga nutrisi pada media habis. Selanjutnya sisa metabolisme yang bersifat racun terakumulasi yang berakibat pada turunnya pertumbuhan pada fase stasioner dan diikuti oleh fase kematian (Al-Qadiri, dkk., 2008).

Kurva pertumbuhan bakteri pada Gambar 1 menunjukkan kecenderungan naiknya suhu mengakibatkan naiknya kurva pertumbuhan (pada level pH sama). Begitu pula kecenderungan naiknya pH berakibat pada naiknya kurva pertumbuhan (pada tingkat suhu sama). Hal ini bisa dijelaskan karena pH dan suhu adalah dua faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

Semua aktifitas biologis pada sel pada dasarnya dipengaruhi oleh enzim yang tergantung pada pH (*pH dependent*) (Talley dan Alexov, 2011). Komponen utama enzim adalah protein. Perubahan pH dapat mempengaruhi stabilitas protein dengan merubah asosiasi antara protein-protein (Schreiber dan Fersht, 1995), protein-ligan (Hom dkk., 2007), protein-membran (Re dkk., 2008) dan peptida-membran (Kono

dkk., 1990) yang pada akhirnya akan mengakibatkan pembentukan *amyloid fibers* dan agregasi molekul pada protein sehingga protein tersebut tidak berfungsi (Talley dan Alexov, 2011).

Suhu adalah faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri selain pH. Daniel, dkk. (2010) menjelaskan bahwa kenaikan suhu menuju titik optimum dibutuhkan enzim guna bertransisi dari bentuk inaktif ( $E_{inact}$ ) ke bentuk aktif ( $E_{act}$ ) menurut teori *Equilibrium Model*. Peralihan enzim dari bentuk inaktif ke bentuk aktif menjadikan enzim tersebut berfungsi sebagai katalis reaksi biokimia hingga mencapai titik puncak dan setelah itu enzim akan bertransisi menjadi bentuk *irreversibly-inactive* dikarenakan mengalami denaturasi.

Analisis regresi kuadratik pada kurva bertujuan menyederhanakan model matematis kurva pertumbuhan. Melalui model kuadratik, titik puncak kurva dapat dicari sebagai nilai  $Y_{maks}$  persamaan. Hasil regresi kuadratik dapat dilihat pada Gambar 2 yang menunjukkan variasi OD puncak pada berbagai kombinasi perlakuan pH dan suhu. Kombinasi perlakuan  $P_3T_2$  (pH 7.0, suhu 32 °C) diketahui menghasilkan OD tertinggi sebesar 1.852 pada  $\lambda$  420 nm.

Sidik ragam menunjukkan perlakuan kombinasi pH dan suhu berpengaruh nyata terhadap nilai OD yang merepresentasikan pertumbuhan bakteri. Adapun berdasarkan uji BNJ, perlakuan  $P_3T_2$  adalah kombinasi perlakuan yang paling sering muncul pada kelas OD tertinggi yaitu 6 kali. Hal tersebut mengindikasikan perlakuan tersebut ( $P_3T_2$  – pH 7.0, suhu 32 °C) adalah yang terbaik dari semua perlakuan berdasarkan uji BNJ.

Hasil analisis komponen utama mendukung hasil analisis regresi kuadratik, sidik ragam dan uji BNJ sebelumnya. *Scatter plot* pada Gambar 3 menunjukkan bahwa perlakuan  $P_3T_2$  adalah perlakuan yang mempunyai total skor positif tertinggi terhadap dua komponen PC1 dan PC2. Total skor perlakuan  $P_3T_2$  adalah 5.188 ( $3.493 PC1 + 1.695 PC2$ ) yang dihitung berdasarkan skor pada Tabel 3.

Pengaruh nyata kombinasi pH dan suhu terhadap pertumbuhan bakteri sesuai sebagaimana diharapkan. Pertumbuhan bakteri dipengaruhi lingkungan hidup bakteri tersebut. Berbagai faktor diantaranya media, nutrisi, pH, temperatur dan oksigen (aerobik atau anaerobik) (Carvalho dkk., 2013). Pada penelitian ini faktor lingkungan merujuk pada media fermentasi, pH dan suhu.

Media fermentasi menggunakan media M63 yang merupakan media minimal. Bakteri yang ditumbuhkan pada media minimal cenderung tumbuh lebih lambat (Elbing dan Brent, 2002). Media ini hanya menyediakan nutrisi pokok yang dibutuhkan berupa garam inorganik, sumber karbon dan air (Atlas, 2010). Hal ini menjelaskan kurva pertumbuhan bakteri baru memasuki fase stasioner di atas 10 jam. Walaupun begitu, penggunaan media ini dirasa tepat karena transisi dari satu fase ke fase lain dapat diamati dengan jelas.

Hasil dari ketiga metode yang digunakan menunjukkan  $P_3T_2$  sebagai perlakuan terbaik. Hal ini dapat dijelaskan karena kombinasi pH dan suhu pada perlakuan tersebut optimum untuk pertumbuhan bakteri.

Pertama, pH-nya netral (pH = 7.0). Bakteri yang digunakan (*Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* sp.) termasuk kategori neutrophile yang optimum tumbuh pada rentang pH netral 6.5-7.5 (Ristuccia dan Cunha, 1984)(Tanisho, 1998). Bakteri tersebut diisolasi dari jaringan tanaman Padi (Susilo, 2015) yang ber-pH netral (Nguyen, 2006). Adapun suhu fermentasi yang diberikan (32 °C) berada mendekati kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Klebsiella* sp. yang optimum 35 °C (Mason dan Hamer, 1987) dan *Enterobacter* sp. yang optimum pada 37 °C (Bevilacqua dkk., 2010).

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa: Kombinasi pH dan suhu berpengaruh terhadap nilai *Optical Density* (OD) hasil fermentasi produksi bakteri endofit pupuk hayati pada panjang gelombang 420 nm. Kombinasi terbaik diperoleh pada kombinasi perlakuan P<sub>3</sub>T<sub>2</sub> yaitu kombinasi pH 7.0 dan suhu 32 °C. Perlakuan tersebut menghasilkan OD puncak 1.852 menurut analisis regresi kuadratik dan total skor 5.188 berdasarkan analisis komponen utama.

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- Al-Qadiri, H., dkk. 2008. *Studying of The Bacterial Growth Phases Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis*. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology. (16).
- Atlas, R. 2010. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press.
- Bevilacqua, A., Cannarsi, M., Gallo, M., Sinigaglia, M. dan Corbo, M.R. 2010. *Characterization and Implications of Enterobacter cloacae Strains, Isolated from Italian Table Olives "Bella di Cerignola"*. Journal Food Science 75(1).
- Carvalho, S., Kuipers, O. dan Neves, A. 2013. *Environmental and Nutritional Factors That Affect Growth and Metabolism of The Pneumococcal Serotype 2 Strain D39 and Its Nonencapsulated Derivative Strain R6*. PloS One.8(3).
- Daniel, R.M., dkk. 2010. *The Molecular Basis of The Effect of Temperature on Enzyme Activity*. Biochemistry Journal. 425.
- Dukan, S. dan Nyström, T. 1998. *Bacterial Senescence: Stasis Results in Increased and Differential Oxidation of Cytoplasmic Proteins Leading to Developmental Induction of the Heat Shock Regulon*. Genes Dev.12(21).
- Elbing, K. dan Brent, R. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. 1997. *Bacterial endophytes in Agrcultural Crops*. Canadian Journal of Microbiology. 43(10).
- Hogg, S. 2006. *Essential Microbiology*. John Wiley and Son's.
- Hom, R.A., dkk. 2007. *pH-dependent Binding of The Epsin ENTH Domain and The AP180 ANTH Domain to PI(4,5)P2-containing Bilayers*. Journal of Molecular Biology. 373(2).
- Khair, M. 2017. *Transfer Gen GFP (Green Fluorescent Protein) Pada Bakteri Endofit Padi serta Uji Resistensinya Terhadap Beberapa Antibiotik*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Pertanian - Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- Kono, K., Kimura, S. dan Imanishi, Y. 1990. *pH-dependent Interaction of Amphiphilic Polypeptide Poly(Lys-Aib-Leu-Aib) with Lipid Bilayer Membrane*. Journal Biochemistry. 29(15).
- Loaces, I., Ferrando, L., dan Scavino, A.F. 2011. *Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-producing Bacteria in Rice*. Journal Microbia Ecology. 61.

- Madigan, M., Martinko, J. dan Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall. New Jersey.
- Mason, C.A. dan Hamer, G. 1987. *Survival and Activity of Klebsiella pneumoniae at Super-optimal Temperatures*. Journal Bioprocess Engineering. 2(3).
- Nguyen, M. 2006. *The Effect of Temperature on The Growth of The Bacteria Escherichia Coli DH5a*. Saint Martin's University Biology Journal.(1).
- Re, F., dkk. 2008. *Prion Protein Structure is Affected by pH-dependent Interaction with Membranes: A Study in a Model System*. FEBS Lett. 582(2).
- Ristuccia, P.A. dan Cunha, B.A. 1984. *Topics in Clinical Microbiology : Klebsiella*. Journal Infection Control. 5(7).
- Rolfe, M., dkk. 2012. *Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation*. Journal of Bacteriology. 194(3).
- Schreiber, G. dan Fersht, A.R. 1995. *Energetics of Protein-protein Interactions: Analysis of The Barnase-barstar Interface by Single Mutations and Double Mutant Cycles*. Journal of Molecular Biology. 248.
- Stanbury, P., Whittaker, A. dan Hall, S. 1995. *Principles of Fermentation Technology, Second Edition*. Butterworth-Heinemann. Massachusetts.
- Susilo, M. 2015. *Uji Potensi Beberapa Bakteri Endofitik Padi Penghasil Hormon Pertumbuhan dan Kemampuan dalam Fiksasi N<sub>2</sub>*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Pertanian - Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- Taghavi, S., dkk. 2010. *Genome Sequence of The Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium Enterobacter sp.* PLoS Genet. 6.
- Talley, K. dan Alexov, E. 2011. *On the pH-Optimum of Activity and Stability of Proteins*. PubMed Central. 78(12).
- Tanisho, S. 1998. *Hydrogen Production by Facultative Anaerob Enterobacter aerogenes*. dalam : Zaborsky O.R., Benemann J.R., Matsunaga T., Miyake J. dan San Pietro, A. BioHydrogen. Springer, Boston.
- Young, L.S., Hameed, A., Peng, S.Y., Shan, Y.H., Wu, S.P. 2013. *Endophytic Establishment of The Soil Isolate Burkholderia sp. CC-A174 Enhances Growth and P-utilization Rate in Maize (Zea mays L.)*. Journal Applied Soil Ecology. 66.