

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi *R. solanacearum* dari Tanaman Kentang

Tanaman kentang yang diduga bergejala penyakit layu *R. solanacearum* diambil dari lahan petani di daerah Cangar, Kecamatan Bumiaji. Gejala tanaman yang terserang penyakit layu ditandai dengan adanya daun layu yang menyebar secara merata pada satu luasan area pertanaman dan diakhiri dengan tanaman yang mati dalam waktu singkat. Menurut Nasrun dan Nuryani (2007) gejala awal serangan penyakit berupa salah satu daun pucuk layu dan diikuti dengan daun bagian bawah. Setelah terlihat gejala lanjut dengan intensitas serangan di atas 50%, tanaman akan mati dalam waktu 7-25 hari.



Gambar 1. Gejala awal tanaman kentang yang terserang penyakit layu *R. solanacearum* dan menyebar secara merata di lapang.

Membuktikan tanaman kentang tersebut terserang penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*, terlebih dahulu memotong bagian batang tanaman kentang yang terserang patogen secara melingkar. Setelah itu batang tersebut dicelupkan pada gelas yang berisi air jernih untuk mengamati massa bakterinya. Selain mengamati massa bakterinya, gejala lainnya yang dapat diketahui yaitu pada bagian akar, batang maupun daun terlihat membusuk dan mengeluarkan aroma yang tidak sedap (Gambar 3). Nasrun dan Nuryani (2007), pada serangan lanjut, akar dan pangkal batang membusuk dan terlihat adanya masa bakteri berwarna kuning keputihan seperti susu. Bentuk gejala ini merupakan ciri khas dari serangan patogen penyakit layu bakteri.



Gambar 2. Gejala layu bakteri *R. solanacearum*. (a) Tanaman kentang yang terserang penyakit layu *R. solanacearum* pada bagian akar, batang maupun daun mulai membusuk; (b) Massa bakteri yang keluar dari jaringan tanaman kentang yang terinfeksi.

Bakteri hasil isolasi digoreskan pada media TZC pada suhu ruang untuk mengetahui bentuk morfologinya. Pada media TZC mula-mula koloni tumbuh berwarna putih dan terdapat warna merah muda dibagian tengahnya. Koloni tersebut muncul sekitar hari kedua.



Gambar 3. Koloni *R. solanacearum* berwarna merah pada media TZC

Koloni yang virulen dan tidak virulen dapat dideteksi dengan menumbuhkan isolat bakteri pada medium *Triphenyltetrazolium Chloride* (TZC). Koloni bakteri virulen berwarna putih dengan pusat berwarna merah muda, dan bentuknya bulat tidak beraturan, sedangkan yang tidak virulen koloni bakterinya berbentuk bulat kecil dengan pusat berwarna merah tua. Pada media cair, bakteri virulen biasanya tidak bergerak, sedangkan bakteri yang tidak virulen aktif bergerak (Hooker, 1993).

Patogen yang diperoleh dari hasil isolasi kemudian diidentifikasi sampai tingkat subspecies yang meliputi: uji hipersensitif, pengamatan morfologi koloni, uji fisiologi dan biokimia.

Uji Hipersensitif

Pada pengujian hipersensitif dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri dari biakan yang telah diinkubasikan 48 jam. Suspensi tersebut diinfiltrasikan pada permukaan bawah daun tembakau yang berumur sedang. Hasil uji hipersensitif pada daun tembakau menunjukkan adanya reaksi tanaman tembakau terhadap *R. solanacearum* dengan ditandai adanya gejala nekrosis daun pada pengamatan 2 hsi (hari setelah inoculasi) dan disertai gejala layu pada seluruh bagian tanaman pada pengamatan 7 hsi. Reaksi positif terlihat jika pada bagian yang diinfiltrasi suspensi bakteri terjadi nekrosis. Gejala tersebut muncul dalam waktu 24-48 jam, sesuai pernyataan Lelliot dan Stead (1987) bahwa reaksi positif akan muncul dalam waktu 24-48 jam. Dalam waktu 5-10 hari gejala nekrotik tampak semakin meluas. Reaksi hipersensitif menyebabkan hancurnya seluruh membran seluler dari sel-sel yang berkontak dengan bakteri yang kemudian diikuti dengan pengeringan dan nekrosis jaringan daun yang terserang bakteri tersebut (Agrios, 2004).



Gambar 4. Hasil uji hipersensitif pada daun tembakau, pada bagian yang ditunjuk dengan panah daun menunjukkan gejala nekrosis

4.2 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Patogen *R. solanacearum*

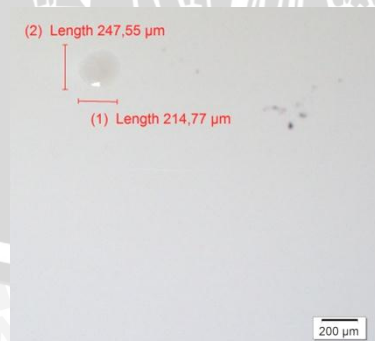
Karakterisasi Morfologi

Isolat bakteri yang menunjukkan reaksi hipersensitif selanjutnya dilakukan pengujian lanjutan untuk mengetahui karakteristiknya. Pengamatan morfologi bakteri *R. solanacearum* dilakukan setelah 24 jam waktu inkubasi. Bakteri diisolasi dari bagian batang tanaman kentang yang bergejala layu. Dari hasil isolasi, bakteri dimurnikan dan digoreskan pada media NA padat untuk diamati koloni tunggalnya. Pengamatan morfologi koloni bakteri mengacu kepada Cappuccino (2005), ciri morfologi koloni bakteri yang diamati mulai dari bentuk, warna, tepian, kenaikan permukaan (elevasi) dan terdapat mucoid. Hasil pengamatan morfologi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel1. Ciri-ciri morfologi isolat bakteri patogen penyebab penyakit layu yang diduga bakteri *R. solanacearum*

Isolat	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Mucoid
<i>R. solanacearum</i>	Bulat	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucoid

Pada pengamatan morfologi koloni bakteri diperoleh hasil bahwa koloni tersebut berbentuk bulat, berwarna putih keruh dengan tepian rata, elevasi cembung dan terdapat mucoid. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan Lelliot dan Stead (1987) yaitu koloni bakteri *R. solanacearum* berbentuk bulat, cembung, serta membentuk koloni berlendir berwarna putih.



Gambar 5. Morfologi koloni bakteri *R. solanacearum*

Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia

Bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi dan menunjukkan gejala hipersensitif selanjutnya diidentifikasi meliputi pengujian gram, uji KOH 3%, pertumbuhan anaerob, pengujian pada media King's B, pengujian pada media YDC, pengujian pada media D1M Agar, dan pengujian pada media arginin. Hasil pengujian fisiologi dan biokimia bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

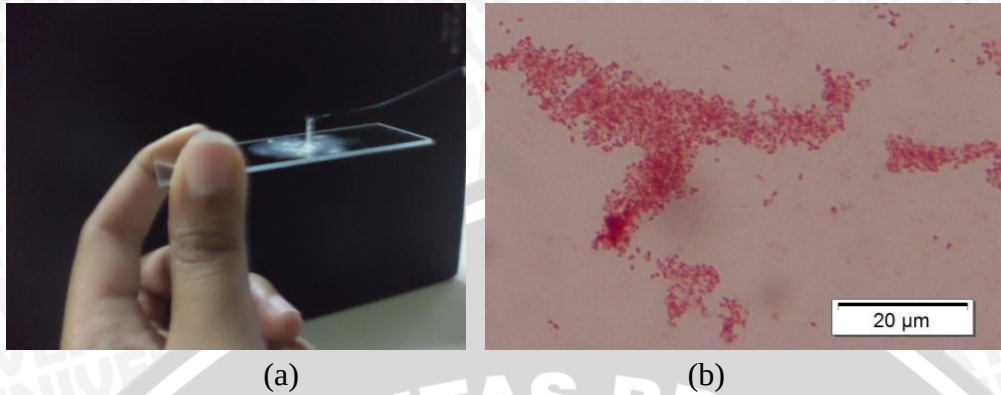
Tabel 2. Hasil uji fisiologi dan biokimia isolat bakteri yang diduga *R. solanacearum*

Uji Fisiologi dan Biokimia	<i>R. solanacearum</i>	Karakterisasi <i>R. solanacearum</i> menurut (Schaad dkk, 2001)
Uji Hipersensitif	+	+
Pengujian Gram	-	-
Pengujian KOH 3%	-	-
Pertumbuhan Anaerob	-	-
Pigmen Flourescen pada Media King's B	-	-
Pertumbuhan pada Media YDC	-	-
Pertumbuhan pada D1M Agar	-	-
Pengujian pada Media Arginin	-	-
Pertumbuhan pada suhu 40°C	-	-

Keterangan: Identifikasi bakteri patogen *R. solanacearum*. (-) bereaksi negatif; (+) bereaksi positif.

1. Pengujian Gram

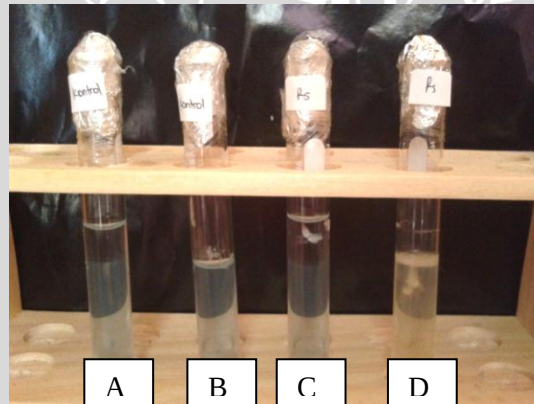
Hasil karakterisasi bakteri menunjukkan gejala layu bakteri termasuk dalam gram negatif. Hal ini ditandai dengan adanya lendir ketika jarum ose diangkat setelah isolat bakteri dicampur dengan KOH 3%. Ciri-ciri bakteri gram negatif yaitu memiliki lapisan peptidoglikan pada dinding sel yang tipis. Perlakuan KOH 3% terhadap massa bakteri gram negatif akan menyebabkan rusaknya dinding sel bakteri dan melepaskan DNA yang merupakan komponen yang bersifat *viscid* atau seperti lendir (Lay, 1994).



Gambar 6. Hasil Pengujian Gram. (a) Pengujian KOH 3% pada bakteri patogen terdapat lendir; (b) Pengamatan mikroskop *R. solanacearum* menunjukkan bakteri gram negatif.

2. Pertumbuhan Anaerob

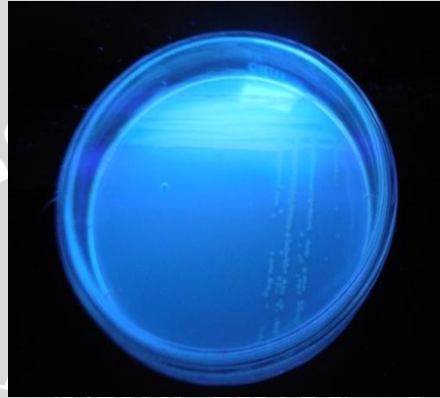
Pada pengujian pertumbuhan anaerob bereaksi negatif yang ditandai dengan perubahan warna media biru menjadi kuning dimulai dari permukaan media yang tidak tertutup minyak parafin setelah masa inkubasi 7-14 hari *R. solanacearum* bersifat oksidatif yang artinya bakteri membutuhkan oksigen untuk tumbuh dan memproduksi asam dalam kondisi aerob, sehingga bakteri termasuk dalam golongan bakteri aerobik (Fahy dan Hayward, 1983).



Gambar 7. Hasil uji OF *R. solanacearum* bereaksi negatif. (A) Kontrol dengan water agar. (B) Kontrol tanpa water agar. (C) *R. solanacearum* dengan water agar. (D) *R. solanacearum* tanpa water agar.

3. Pengujian Pigmen Flourescen pada Media King's B

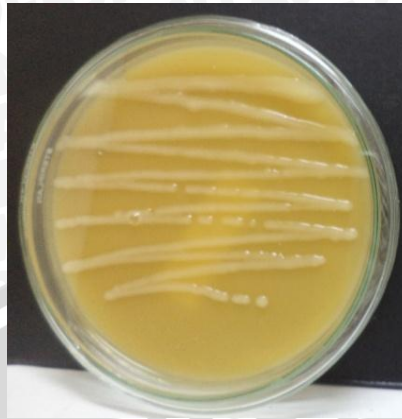
R. solanacearum yang ditumbuhkan pada media King's B dan diinkubasikan selama 24 jam, setelah diamati di bawah sinar UV terlihat tidak berpendar hijau muda menyala. Menurut Schaad (2001), adanya pigmen flourescen setelah bakteri ditumbuhkan pada media King's B menunjukkan bahwa bakteri termasuk golongan *Pseudomonas flourescens*.



Gambar 8. Koloni *R. solanacearum* pada media King's B tidak mengeluarkan pigmen flourescent di bawah sinar UV

4. Pertumbuhan pada Media YDC

Pengujian pada media YDC bertujuan untuk mengetahui apakah koloni berwarna kuning atau tidak. Reaksi positif apabila terbentuk koloni berwarna kuning yang merupakan bakteri *Xylophilus* sp. dan *Xanthomonas* sp. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa koloni *R. solanacearum* yang ditumbuhkan pada media YDC dan diinkubasikan 24-48 jam tidak berwarna kuning. Berdasarkan Schaad *et al.* (2001) untuk genus *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Acidovorax* dan *Burkholderia* koloni bakteri tidak berwarna kuning pada media YDC. Sedangkan untuk genus *Xylophilus* sp. dan *Xanthomonas* sp. pada media YDC akan menghasilkan koloni bakteri dengan warna kuning.

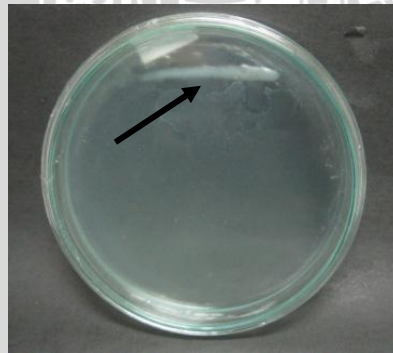


Gambar 9. Koloni *R. solanacearum* berwarna putih susu pada media YDC

5. Pengujian D1M Agar

Pada pengujian berikutnya yaitu pengujian D1M Agar bakteri uji yang diinkubasikan selama 24-48 jam tidak menunjukkan adanya pertumbuhan pada media. Menurut Schaad (2001), pengujian pada media D1M Agar bertujuan untuk membedakan jenis bakteri genus *Agrobacterium* sp. Sedangkan bakteri dari genus *Acidovorax*, *Burkholderia*, dan *Ralstonia* tidak mampu tumbuh pada media tersebut.

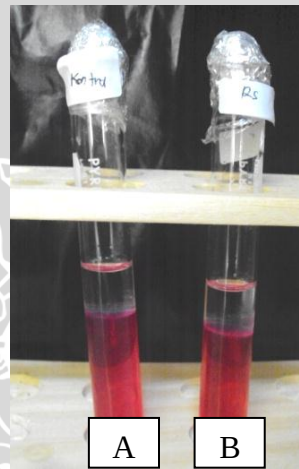
Hasil dari pengujian pada media D1M agar menunjukkan bahwa bakteri *R. solanacearum* bereaksi negatif. Hal ini ditandai dengan koloni bakteri yang tidak tumbuh pada media yang diinkubasi selama 48 jam, hanya terlihat goresan awal saat *streak* bakteri pada media tersebut.



Gambar 10. Panah menunjukkan koloni bakteri tidak tumbuh setelah 24 jam dan hanya ada koloni awal pada saat bakteri ditanam pada media D1M agar

6. Pengujian pada Media Arginin

Hasil dari pengujian pada media arginin menunjukkan bahwa bakteri *R. solanacearum* bereaksi negatif. Hal ini ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media menjadi merah muda jambu. Reaksi yang positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi lebih merah pada tabung yang ditutup minyak parafin, sedangkan yang kontrol tetap berwarna merah jambu (Lelliot dan Stead, 1987). Menurut Schaad *et al.* (2001) bakteri dari genus *Burkholderia* mampu menunjukkan reaksi positif sedangkan bakteri dari genus *Acidovorax* dan *Ralstonia* menunjukkan reaksi negatif jika diuji pada media arginin.



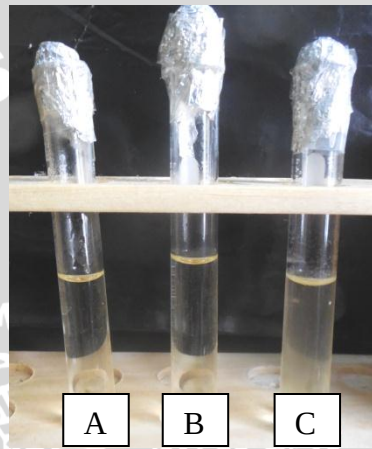
Gambar 11. Hasil uji arginin bereaksi negatif. (A) Kontrol dengan minyak parafin, (B) *R. solanacearum* dengan minyak parafin.

7. Pengujian pertumbuhan pada suhu 40°C

Pengujian ini dilakukan untuk membedakan genus *Ralstonia* dengan genus *Acidovorax*. Pada perlakuan suhu 40°C dan diinkubasi selama 24 jam *R. solanacearum* tidak mampu tumbuh pada media NB. Menurut Nasrun dkk. (2007) bakteri genus *Ralstonia* mampu tumbuh dan berkembang pada suhu 13-37°C, dan tidak dapat tumbuh pada suhu 41°C. Untuk memastikan bahwa *R. solanacearum* tidak mampu tumbuh pada suhu 40°C maka diberikan kontrol dan pembandingan. Kontrol merupakan media NB steril yang tidak diinokulasikan *R. solanacearum* dan diberi perlakuan suhu 40°C, sedangkan pembandingan yang digunakan adalah *R. solanacearum* yang diinokulasikan pada media NB namun diinkubasi pada suhu ruang 26°C. Berdasarkan Schaad *et al.* (2001) genus *Acidovorax* mampu memberikan

reaksi positif yaitu mampu tumbuh jika diberi perlakuan suhu 40°C, sedangkan untuk genus *Ralstonia* tidak mampu tumbuh pada perlakuan suhu 40°C. Sehingga dapat diketahui bahwa *R. solanacearum* tidak termasuk dalam genus *Acidovorax* dan merupakan salah satu spesies dalam genus *Ralstonia*.

Berdasarkan pengamatan morfologi koloni, hasil uji hipersensitif, uji fisiologi dan biokimia untuk mengetahui genus dan spesies isolat bakteri tersebut termasuk dalam genus *Ralstonia*, kemudian termasuk kedalam spesies *R. solanacearum*.



Gambar 12. Hasil uji perlakuan suhu 40°C. (A) Media NB yang diinokulasikan *R. solanacearum* dan diberi perlakuan suhu. (B) Media NB yang tidak diinokulasikan *R. solanacearum* dan diberi perlakuan suhu. (C) Media NB yang diinokulasikan *R. solanacearum* dan tidak diberi perlakuan suhu.

4.3 Pengujian Antagonis Bakteri Endofit dalam Cawan Petri (*in vitro*) Terhadap *R. solanacearum*

Bakteri endofit diuji daya antagonisnya terhadap *R. solanacearum* secara *in vitro* dengan menggunakan metode *overlay*. Hasil pengujian daya antagonis bakteri endofit dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel3.Hasil uji antagonis bakteri endofit terhadap pertumbuhan *R. solanacearum* pada cawan petri

Isolat Endofit	Rerata penghambatan bakteri endofit terhadap <i>R. solanacearum</i> pada (hsi) hari setelah inokulasi(cm)		
	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
Kontrol	0.00 a	0.00 a	0.00 a
E1	1.61 d	1.66 de	1.69 de
E5	1.73 d	1.87 de	1.91 de
E6	1.56 d	1.66 de	1.71 de
E104	0.79 b	0.83 b	0.86 b
E117	1.24 c	1.35 cd	1.39 cd
E120	0.80 b	0.87 b	0.95 b
E121	1.01 bc	1.12 bc	1.14 bc
E129	0.00 a	0.96 b	1.02 b

Keterangan: - Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan menunjukkan tidak berbeda nyata antar isolat endofit dan kontrol aplikasi menggunakan aquades.
 - E diikuti angka adalah kode isolat bakteri endofit.

Hasil analisis menggunakan uji Duncan pada taraf kesalahan 0,05 menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata antar perlakuan dalam menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* selama tiga hari pengamatan (Tabel 3). Penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara perlakuan bakteri endofit E1, E5, E6, E104, E117, E120, E121, E129 jika dibandingkan dengan kontrol aquades. Penghambatan bakteri endofit diduga bahwa bakteri endofit tersebut memiliki senyawa antibakteri. Aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji ditunjukkan dengan terlihatnya zona bening disekeliling kertas saring. Pada kontrol aquades tidak terdapat zona hambat disekeliling kertas saring, sehingga dapat diketahui pemberian aquades tidak berpengaruh terhadap penghambatan *R. solanacearum*.

Pada pengamatan hari pertama, isolat endofit E5 memberikan pengaruh terbesar terhadap uji penghambatan bakteri *R. solanacearum* sebesar 1,73 cm dibandingkan dengan isolat endofit E129 dan kontrol. Zona hambat yang dihasilkan berbeda nyata dengan kontrol aquades, sehingga diketahui E5 mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*. Sedangkan isolat endofit E129 memiliki daya hambat terkecil sebesar 0,00 cm dibandingkan dengan E104 yakni 0,79 cm.

Pada hari kedua setelah inokulasi, isolat endofit E5 memiliki zona hambat lebih besar dari isolat endofit E1 dan E6 sebesar 1,87 cm. Zona hambat yang dihasilkan berbeda nyata dengan kontrol aquades, sehingga diketahui E5 mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*. Isolat endofit E129 mengalami peningkatan zona hambat sebesar 0,96 cm, sedangkan isolat endofit E104 memiliki zona hambat lebih kecil dalam menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* sebesar 0,83 cm.

Isolat endofit E5 memberikan pengaruh yang terbesar terhadap uji penghambatan bakteri *R. solanacearum* pada hari ketiga setelah inokulasi sebesar 1,91 cm. Namun, zona hambat yang dihasilkan isolat endofit E5 tidak berbeda jauh dengan isolat bakteri E6 dan E1 yakni 1,71 dan 1,69 cm. Pada isolat bakteri E104 memiliki zona hambat terkecil dalam menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* yakni sebesar 0,86 cm. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, semakin besar juga tingkat penekanannya terhadap pertumbuhan patogen. Diduga bakteri endofit tersebut mengeluarkan antibiotik tertentu yang dapat menghambat bakteri *R. solanacearum* secara *in vitro*.

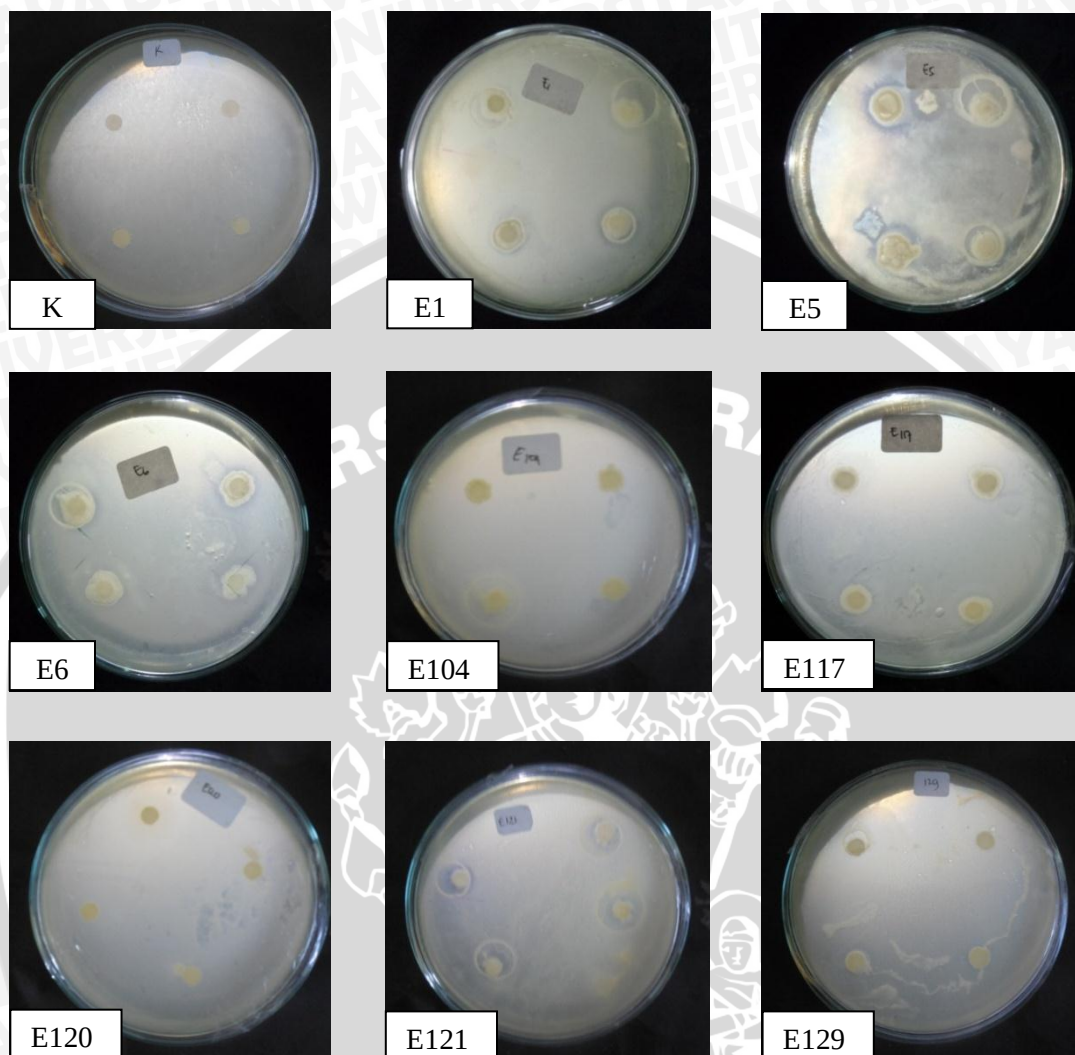
Menurut Cook dan Baker (1983), bahwa ada beberapa mikroorganisme yang mampu menghasilkan suatu senyawa beracun yang didifusikan ke dalam media buatan (NA) sehingga dapat menghambat aktivitas metabolisme dan pertumbuhan mikroorganisme lain, salah satunya adalah senyawa antibiotik. Menurut Waksman (1947), antibiotik adalah bahan kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bahkan mematikan mikroorganisme lain, sedangkan peristiwanya sendiri dikatakan sebagai antibiosis. Bakteri seperti genus *Erwinia*, *Corynebacterium* dan *Pseudomonas* dapat memproduksi zat antibiotik. Bakteri *Corynebacterium* sp. merupakan salah satu agens hayati yang bersifat antagonis (agens antagonis) yang dapat mengendalikan beberapa jenis OPT yakni *Xanthomonas campestris* sp. *oryzae*, *Pseudomonas* sp., *Helminthosporium* sp., *Cercospora* sp., dan *R. solanacearum* (BPTPH, 2008).

Bakteri antagonis dilaporkan dapat menekan pertumbuhan patogen dalam tanah, beberapa genus yang banyak digunakan adalah *Agrobacterium*, *Bacillus* dan *Pseudomonas* (Brock and Madigan, 1988). Dwijoseputro (1989) mengemukakan

bahwa terdapat banyak jenis bakteri dari genus *Bacillus* yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan antibiotik seperti basitrasin, subtilin, polimixin dan tirotsin. Berdasarkan Oktavia dan Lan (2014), genus *Erwinia* termasuk dalam golongan keluarga *Enterobacteriaceae* yang terdiri dari 51 genus dan 238 spesies. Selain ada yang sebagai patogen tanaman yang menyebabkan berbagai infeksi, ada banyak aplikasi yang menggunakan anggota *Enterobacteriaceae* termasuk biokontrol di bidang pertanian, produksi berbagai protein rekombinan dan produk non protein, pengendalian penyakit infeksi, agen antikanker dan bioremediasi.

Senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri antagonis dapat berperan langsung sebagai bakterisida terhadap bakteri patogen dan agens penginduksi (*elicitor*) ketahanan tanaman terhadap penyakit (Lyon, 2007). Pada bakteri endofit, senyawa antibiotik yang dihasilkannya diduga lebih banyak berperan sebagai *elicitor* untuk menginduksi ketahanan tanaman dibandingkan berperan langsung sebagai bakterisida dimana bakteri endofit memerlukan kontak langsung dengan patogen tanaman. Hal ini disebabkan karena bakteri endofit yang berada dalam jaringan tanaman populasinya lebih sedikit dibandingkan dengan populasi patogen sehingga kemampuan dari bakteri endofit yang dapat melakukan kontak langsung dengan patogen lebih sedikit. Disamping itu, antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri endofit dalam jumlah banyak pada jaringan tanaman dapat berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan tanaman. Mourhofer *et al.* (1995) melaporkan bahwa antibiotik pyoluteorin dan 2,4-diacetylphloroglucinol (DPAG) yang dihasilkan oleh *Pseudomonas* spp. bersifat fitotoksik pada konsentrasi tinggi.

Menurut Stobel (2002), terbentuknya zona hambat juga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan bakteri uji yang berlebihan sehingga pengaruh metabolit yang dihasilkan oleh bakteri endofit tidak signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *R. solanacearum*, jamur *Fusarium* sp. dan jamur *P. Infestan*.



Gambar 13. Penghambatan pertumbuhan *R. solanacearum* oleh bakteri endofit dan kontrol (pengamatan hari ketiga).

Keterangan:

K: kontrol aquades, E1: bakteri endofit 1, E5: bakteri endofit 5, E6: bakteri endofit 6, E104: bakteri endofit 104, E117: bakteri endofit 117, E120: bakteri endofit 120, E121: bakteri endofit 121 dan E129: bakteri endofit 129.

4.4 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit

Karakterisasi Morfologi

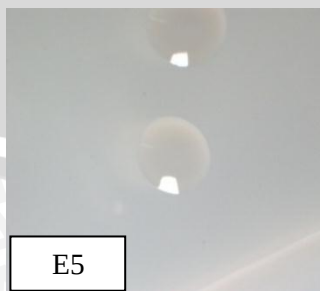
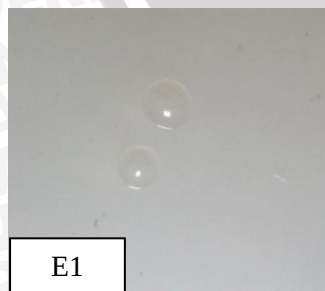
Delapan bakteri endofit yang terpilih ditumbuhkan pada media NA padat dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang yang bertujuan untuk menghasilkan koloni tunggal yang akan di amati. Berikut ini hasil pengamatan morfologi dari isolat bakteri endofit yang terpilih didapatkan ciri-ciri seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Ciri-ciri morfologi isolat bakteri endofit yang digunakan dalam pengujian di cawan petri.

Isolat	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Mucoid
E1	Bulat	Putih Bening	Rata	Cembung	Mucoid
E5	Bulat	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucoid
E6	Bulat lonjong	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucoid
E104	Bulat	Putih	Bergelombang	Rata	Tidak Mucoid
E117	Bulat	Putih keabuan	Tidak Rata	Rata	Sedikit Mucoid
E120	Bulat	Putih Keruh	Tidak Rata	Cembung	Mucoid
E121	Bulat	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucoid
E129	Bulat	Putih Bening	Rata	Cembung	Mucoid

Keterangan :Morfologi bakteri endofit yang digoreskan pada media NA. E1: bakteri endofit dengan kode isolat 1, E5: bakteri endofit dengan kode isolat 5, E6: bakteri endofit dengan kode isolat 6, E104: bakteri endofit dengan kode isolat 104, E117: bakteri endofit dengan kode isolat 117, E120: bakteri endofit dengan kode isolat 120, E121: bakteri endofit dengan kode isolat 121, dan E129: bakteri endofit dengan kode isolat 129.

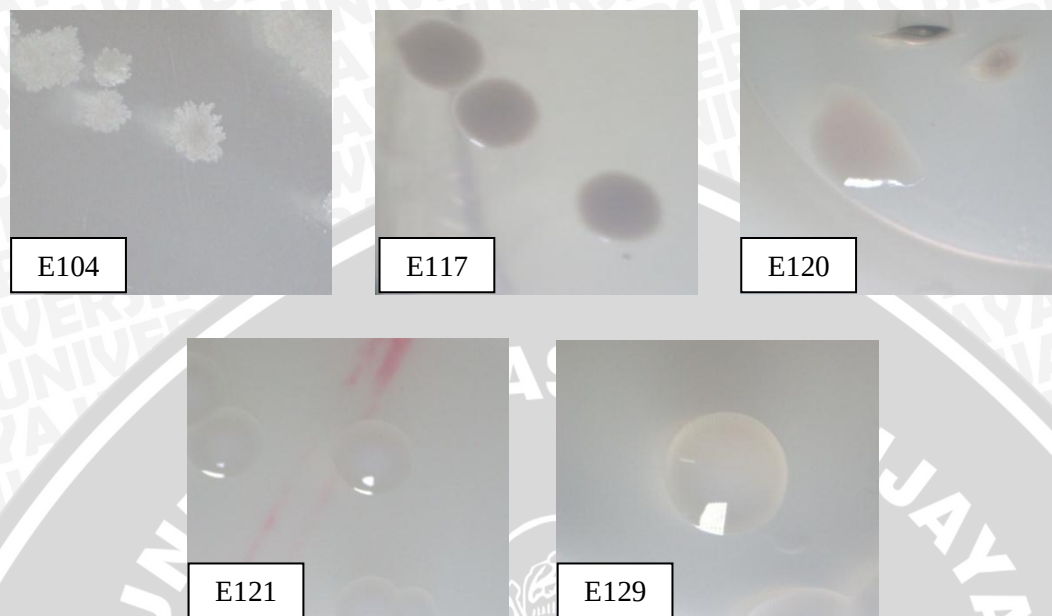
Hasil pengamatan menunjukkan masing-masing bakteri endofit memiliki morfologi yang berbeda-beda. Koloni dari masing-masing biakan bakteri endofit yang terpilih dapat di lihat pada Gambar 16.



E1

E5

E6



Gambar 14. Bentuk koloni bakteri endofit yang digunakan dalam pengujian pada media NA. E1: bakteri endofit dengan kode isolat 1, E5: bakteri endofit dengan kode isolat 5, E6: bakteri endofit dengan kode isolat 6, E104: bakteri endofit dengan kode isolat 104, E117: bakteri endofit dengan kode isolat 117, E120: bakteri endofit dengan kode isolat 120, E121: bakteri endofit dengan kode isolat 121, dan e129: bakteri endofit dengan kode isolat 129.

Berdasarkan dari Tabel 4 terdapat 8 isolat bakteri endofit dengan karakter morfologi yang berbeda. Bentuk koloni isolat bakteri endofit semuanya berbentuk bulat, sedangkan warna koloni didominasi dengan warna putih keruh dan dilanjutkan dengan warna putih bening, putih dan putih keabuan.

Bentuk elevasi koloni bervariasi dan didominasi dengan bentuk cembung. Terdapat 2 isolat bakteri endofit dengan bentuk elevasi koloni rata yakni bakteri endofit E104 dan E117. Sedangkan bentuk tepian koloni bakteri endofit didominasi dengan tipe rata dilanjutkan dengan bentuk tidak rata dan bergelombang. Umumnya koloni bakteri endofit terdapat mucoid, hanya ada beberapa koloni yang tidak terdapat mucoid.

Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia

Pengujian tahap berikutnya yakni pengujian fisiologi dan biokimia yang meliputi: uji hipersensitif, pengujian gram, pengujian KOH 3%, pengecatan endospora, pertumbuhan anaerob, uji katalase, uji oksidatif, fermentatif glukosa, pigmen flourescen pada media King's B, pertumbuhan pada media YDC dan pertumbuhan pada D1M agar. Hasil pengujian fisiologi dan biokimia pada bakteri endofit yang terpilih dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Karakterisasi fisiologi dan biokimia bakteri endofit

Karakterisasi	E1	E5	E6	E104	E117	E120	E121	E129
Uji Hipersensitif	-	-	-	-	-	-	-	-
Pengujian Gram	-	-	-	+	+	+	-	-
Pengecatan Endospora	-	-	-	+	-	-	-	-
Pertumbuhan Anaerob	-	-	-	-	-	-	-	-
Uji Katalase	-	-	-	-	+	+	-	-
Uji Oksidatif	-	+	+	-	-	-	-	+
Fermentasi Glukosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmen Flourescen pada Media King's B	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada Media YDC	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada D1M Agar	-	+	+	-	-	-	-	+

Keterangan: Karakterisasi fisiologi dan biokimia bakteri endofit. (-) : reaksi negatif; (+) : reaksi positif. E1: *Erwinia*, E5: *Agrobacterium*, E6: *Agrobacterium*, E104: *Bacillus*, E117: *Corynebacterium*, E120: *Corynebacterium*, E121: *Erwinia*, dan E129: *Agrobacterium*.

1. Uji Hipersensitif

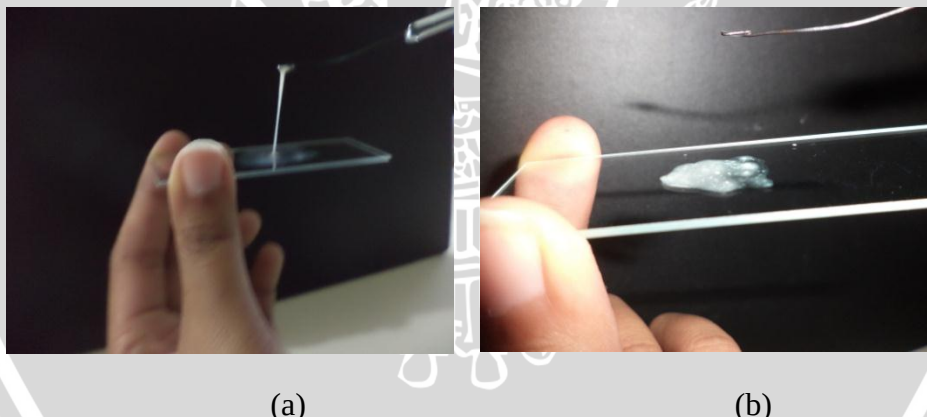
Uji hipersensitif bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut patogen bagi tanaman atau tidak. Hasil uji hipersensitif 8 bakteri endofit pada daun tembakau menunjukkan tidak adanya gejala nekrosis atau perubahan warna pada titik inokulasi. Menurut Agrios (2004), bahwa daun yang tidak menunjukkan perubahan warna (nekrotik) di titik inokulasi merupakan bakteri yang bersifat non patogen, sedangkan daun yang menunjukkan perubahan warna (nekrotik) di titik inokulasi merupakan bakteri patogen.

2. Uji Gram

Uji gram merupakan pengujian yang paling penting untuk menentukan bakteri tersebut termasuk dalam gram positif atau gram negatif. Pada tabel diatas, diketahui

bahwa dari 8 jumlah isolat bakteri endofit pada pengujian gram, tiga diantaranya termasuk gram positif. Bakteri tersebut adalah isolat E104, E117 dan E120. Hal ini ditunjukkan dengan adanya suspensi bakteri yang tidak membentuk benang pada pengujian kalium hidroksida (KOH) 3% dan bakteri akan menunjukkan warna ungu apabila diamati di bawah mikroskop. Selain itu, dari hasil pengamatan mikroskop, ketiga isolat bakteri endofit berbentuk basil (batang). Sedangkan enam bakteri endofit lainnya termasuk dalam gram negatif yakni E1, E5, E6, E121, dan E129. Keenam bakteri endofit menunjukkan adanya benang pada pengujian KOH 3% dan bakteri berwarna merah apabila diamati di bawah mikroskop. Bentuk dari 6 bakteri endofit gram negatif menunjukkan basil (batang).

Menurut Schaad *et al.* (2001), bahwa pada pengujian KOH 3% bakteri Gram negatif menjadi berlendir jika ose diangkat, sedangkan bakteri Gram positif tidak berlendir. Begitu juga dengan pengecatan gram, berdasarkan Schaad *et al.* (2001) hasil uji Gram dengan teknik pewarnaan untuk bakteri Gram positif berwarna ungu sampai biru kehitaman, sedangkan Gram negatif berwarna merah.



Gambar 15. Pengujian Gram. (a) lendir massa bakteri terangkat (gram -); (b) tidak ada lendir massa bakteri dan tidak terangkat (gram +).

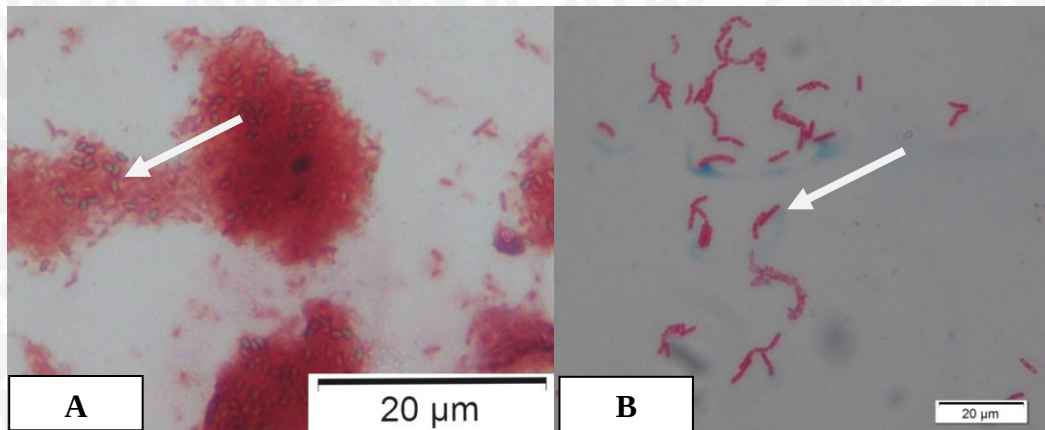
Perbedaan hasil pewarnaan gram disebabkan karena adanya perbedaan struktur dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut sehingga menyebabkan perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna dan penambahan zat pemucat. Bakteri gram positif akan mempertahankan zat pewarna Kristal violet akan tampak berwarna ungu tua

dibawah mikroskop. Adapun gram negatif akan kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol, dan sewaktu diberi zat zat pewarna tandingannya yaitu dengan zat pewarna safranin akan tampak berwarna merah. Perbedaan warna ini disebabkan oleh perbedaan dalam struktur kimiawi dinding selnya (Pelezar, 1989).

Sebagian besar dinding sel bakteri gram positif terdiri dari peptidoglikan, sedangkan bakteri gram negatif terdiri dari kandungan lipid yang tinggi dibandingkan bakteri gram positif. Seperti yang dikatakan Jawetz (1995), perbedaan kepekaan pada bakteri gram positif dan bakteri gram negatif terhadap zat antibakteri karena perbedaan struktur dinding sel, seperti jumlah peptidoglikan, jumlah lipid, ikatan silang, aktivitas enzim yang menentukan penetrasi, peningkatan dan aktivitas antibakteri.

3. Pengecatan Spora

Pengecatan spora merupakan uji lanjutan untuk bakteri gram positif. Metode pewarnaan spora dimaksudkan untuk mengetahui apakah bakteri membentuk spora atau tidak. Spora bakteri akan tampak berwarna kehijauan sedangkan sel vegetatifnya akan berwarna merah (Schaad *et al.*, 2001). Dari hasil pengamatan di bawah mikroskop diketahui bahwa bakteri endofit E104 menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan adanya spora bakteri berwarna hijau dan sel vegetatifnya berwarna merah sedangkan bakteri endofit E117 dan E120 menunjukkan reaksi negatif.

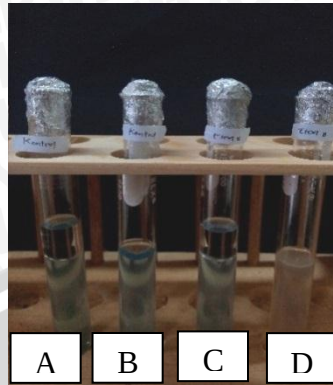


Gambar 16. Pengujian Spora. a) Spora bakteri berwarna hijau dan sel vegetatifnya berwarna merah; b) Sel vegetatif bakteri berwarna merah.

4. Pertumbuhan Anaerob

Pada uji pertumbuhan secara anaerob, bakteri endofit ditumbuhkan pada 2 media, media yang dilapisi dengan parafin dan media yang tidak dilapisi parafin. Media yang dilapisi parafin merupakan media kedap udara. Perubahan warna pada media dari biru menjadi kuning yang telah diinokulasi sekitar 24 jam. Hasil pengujian pertumbuhan anaerob pada bakteri gram positif yakni isolat E104 menunjukkan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media yang ditutup parafin.

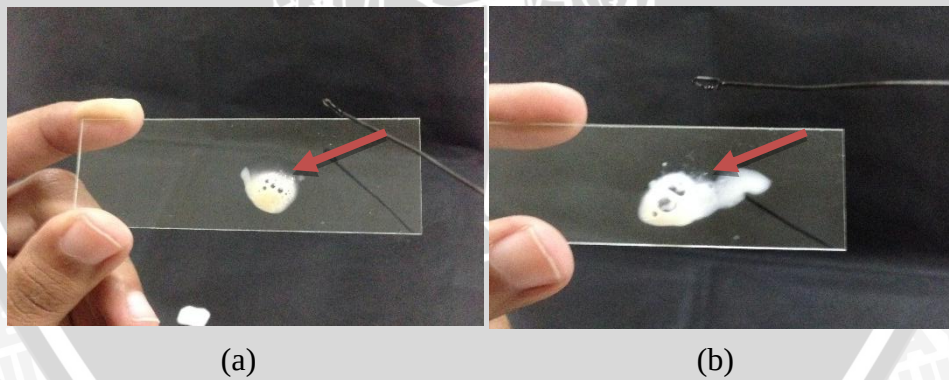
Reaksi positif (anaerob) terjadi jika tabung yang diberi minyak parafin berubah warna menjadi kuning atau kedua tabung berubah warna menjadi kuning. Isolat yang bersifat anaerob tidak diuji lebih lanjut (Kerr, 1980). Perubahan warna media terjadi pada tabung tanpa parafin sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat E104 termasuk dalam genus *Bacillus* spp.



Gambar 17. Pertumbuhan anaerob pada isolat E104 bereaksi negatif. (A) Kontrol dengan parafin; (B) Kontrol tanpa parafin; (C) E104 dengan parafin; (D) E104 tanpa parafin.

5. Uji Katalase

Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri tertentu untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim katalase atau tidak. Enzim tersebut merupakan katalisator dalam penguraian hydrogen-peroksida (H_2O_2) untuk menghasilkan oksigen dan air. Produksi katalase bisa diidentifikasi dengan menambahkan reagen H_2O_2 pada suspensi bakteri. Jika menghasilkan gelembung gas, berarti bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase. Sedangkan reaksi negatif apabila bakteri tidak menghasilkan gelembung gas.



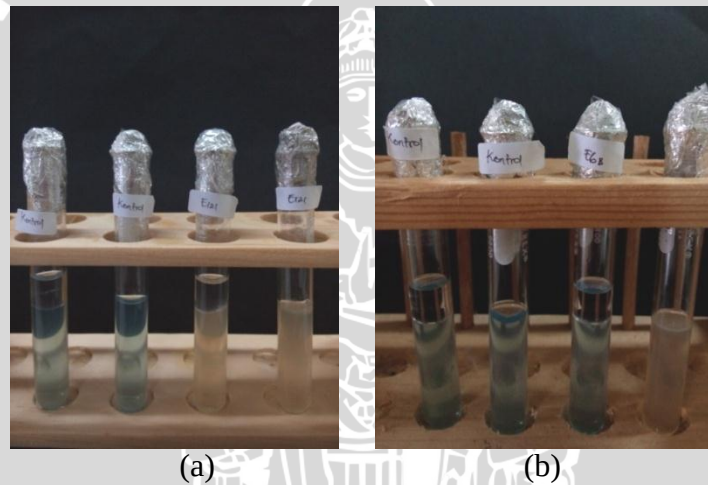
Gambar 18. Uji katalase bereaksi positif. (a) Isolat E117 dan (b) Isolat E120 menghasilkan gelembung gas yang ditunjukkan oleh tanda panah.

Berdasarkan hasil uji katalase, pada (Gambar 20) isolat E117 dan E120 menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan adanya gelembung gas. Menurut Lay (1994) timbulnya gelembung-gelembung udara pada uji katalase membuktikan

bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase sehingga mampu mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

6. Uji Oksidatif

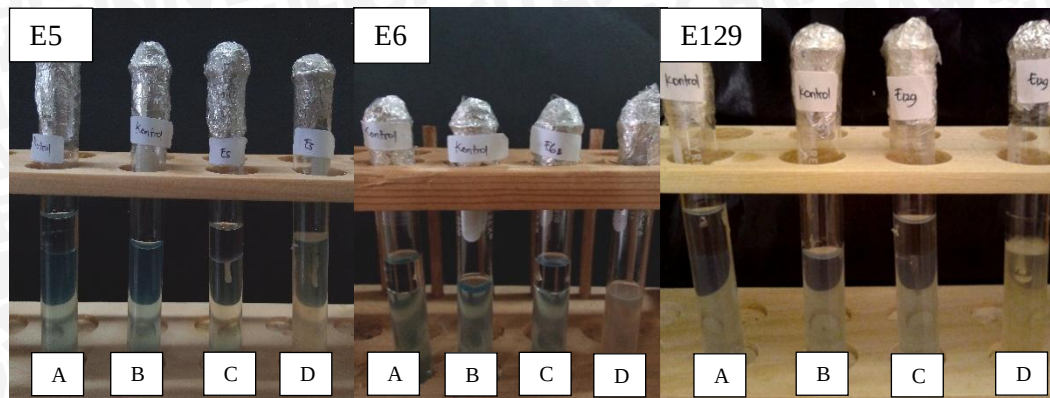
Pada pengujian oksidatif, diperoleh hasil isolat yang bereaksi positif yakni E5, E6 dan E129 ditandai dengan media yang ditutup parafin tidak terjadi perubahan warna dan pada media yang tidak ditutup parafin terjadi perubahan warna menjadi kuning. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Schaad (2001), bahwa reaksi bersifat oksidatif ditunjukkan apabila pada media yang ditutup parafin cair steril tidak terjadi perubahan warna dan pada media yang tidak ditutup parafin cair steril terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Sedangkan isolat yang bereaksi negatif yakni E1 dan E121.



Gambar 19. Hasil uji oksidatif. (a) Bakteri bereaksi negatif ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna pada kedua tabung; (b). Bakteri bereaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna media tanpa parafin saja.

7. Fermentasi Glukosa

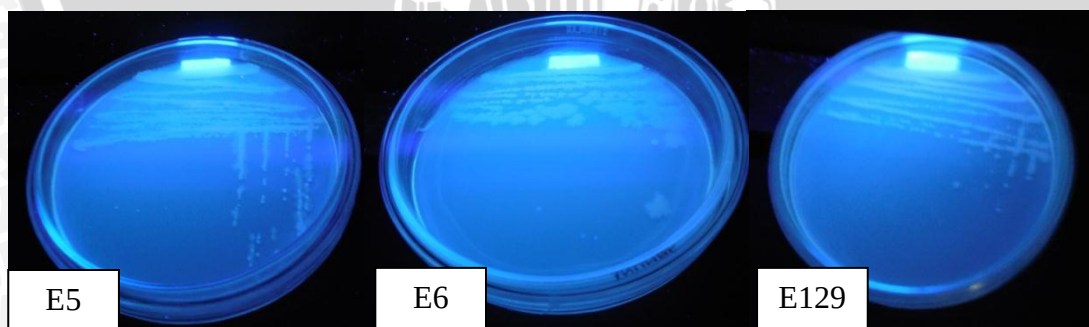
Uji fermentasi glukosa bertujuan untuk mengetahui sifat fermentasi bakteri terhadap glukosa dengan menggunakan dua tabung media yang salah satunya ditutup dengan parafin, sehingga diharapkan di dalam media tidak terdapat udara yang dapat mendukung terjadinya fermentasi (Schaad, 2001). Hasil pengujian diketahui bahwa isolat E5, E6 dan E129 bereaksi negatif.



Gambar 20. Hasil uji fermentasi glukosa. (A) Kontrol dengan parafin; (B) Kontrol tanpa parafin; (C) Bakteri dengan parafin; (D) Bakteri tanpa parafin.

8. Pigmen Fluorescen pada Media King's B

Pengujian ini digunakan untuk membedakan apakah bakteri menghasilkan pigmen fluorescen atau tidak. Menurut Schaad *et al.*, (2001), bakteri yang mampu menghasilkan pigmen fluorescen memperlihatkan warna hijau muda menyala disekitar koloni dibawah sinar ultra violet dan pigmen ini akan tampak nyata. Masing-masing bakteri endofit ditumbuhkan pada media King's B dan diinkubasi selama 24 jam lalu diamati dibawah sinar ultra violet. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa bakteri endofit E5, E6 dan E129 semuanya tidak ada yang mampu menghasilkan pigmen fluorescen.



Gambar 21. Koloni bakteri endofit E5, E6 dan E129 pada media King's B tidak mengeluarkan pigmen fluorescen di bawah sinar UV.

9. Pertumbuhan pada Media YDC

Yeast Dextrose Carbonat (YDC) merupakan media semiselektif untuk pertumbuhan bakteri *Xanthomonas* sp. dan menjadi uji untuk membedakan antara bakteri *Xanthomonas* sp. dengan *Xylophilus* sp (Schaad *et al.*, 2001). Bakteri uji digoreskan pada media YDC yang kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 33°C. Reaksi positif ditunjukkan dengan munculnya koloni bakteri berwarna kuning pada media. Berdasarkan pengujian ini bakteri endofit E5, E6 dan E129 koloni yang tumbuh tidak berwarna kuning. Sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga bakteri endofit tersebut tidak termasuk bakteri *Xanthomonas* sp. dengan *Xylophilus* sp. Selanjutnya pengujian media YDC pada bakteri endofit E1 dan E121 menunjukkan hasil yang negatif (koloni bakteri yang tumbuh tidak berwarna kuning), sehingga kedua bakteri endofit tersebut termasuk dalam genus *Erwinia*.



Gambar 22. Koloni bakteri endofit pada media YDC berwarna putih.

10. Pertumbuhan pada D1M Agar

Media ini merupakan media semiselektif yang digunakan untuk membedakan bakteri *Agrobacterium* sp. dari *Acidovorax*, *Burkholderia*, dan *Ralstonia*. Bakteri yang dapat tumbuh pada media ini menunjukkan hasil positif (+), yaitu jenis bakteri dari genus *Agrobacterium* sp. (Schaad *et al.*, 2001). Dari hasil pengujian pertumbuhan pada D1M agar, diketahui bahwa bakteri endofit E5, E6 dan E129 menunjukkan hasil positif. Dengan demikian, ketiga bakteri endofit tersebut termasuk dalam genus *Agrobacterium*.

Identifikasi Bakteri Endofit dari Tanaman Kentang

Delapan isolat bakteri endofit terpilih dari koleksi Laboratorium Bakteriologi selanjutnya diidentifikasi berdasarkan pengamatan morfologi koloni, fisiologi dan biokimia sampai tingkat genus berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) sebagai berikut :

a. Isolat E1

Bakteri endofit terpilih dari koleksi Laboratorium Bakteriologi berbentuk bulat, berwarna bening dengan tepian rata, elevasi cembung serta terdapat mucoid. Pengujian fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa reaksi gram negatif berbentuk batang, oksidatif negatif, koloni pada media YDC tidak berwarna kuning. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut termasuk dalam genus *Erwinia*, famili *Enterobacteriaceae*.

b. Isolat E5

Bakteri endofit selanjutnya yaitu E5 berbentuk bulat, warna koloni putih keruh dengan tepian rata, elevasi cembung dan terdapat mucoid. Pada pengujian fisiologi dan biokimia diketahui bahwa bakteri endofit termasuk gram negatif berbentuk batang, bersifat oksidatif positif, fermentasi glukosa negatif, tidak terdapat pigmen fluorescent, bereaksi negatif pada media YDC, dan koloni bakteri dapat tumbuh pada D1M agar. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Agrobacterium*.

c. Isolat E6

Bakteri endofit ini berbentuk bulat lonjong, berwarna putih keruh, tepiannya rata dengan elevasi cembung dan terdapat mucoid. Pada pengujian fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa reaksi gram negatif berbentuk batang, reaksi oksidatif positif, uji fermentasi glukosa bereaksi negatif, tidak terdapat pigmen fluorescent, reaksi negatif pada media YDC, dan reaksi positif pada D1M agar. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Agrobacterium*.

d. Isolat E104

Koloni bakteri berbentuk bulat dengan warna koloninya putih, tepiannya bergelombang, elevasinya rata serta tidak terdapat mucoid. Pengujian fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa bakteri termasuk gram positif berbentuk batang, mempunyai spora, dan uji pertumbuhan anaerob negatif. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Bacillus* spp.

e. Isolat E117

Bakteri endofit memiliki bentuk bulat, warna koloni putih keabuan, tepiannya tidak rata, elevasinya rata dan tidak mucoid. Pada pengujian fisiologi dan biokimia diketahui bahwa bakteri endofit tersebut gram positif berbentuk batang, tidak mempunyai spora dan uji katalase bereaksi positif. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Corynebacterium*.

f. Isolat E120

Bentuk dari bakteri endofit E120 bulat, berwarna putih keruh, tepiannya tidak rata dengan elevasi cembung dan terdapat mucoid. Pada pengujian fisiologi dan biokimia menunjukkan hasil gram positif berbentuk batang, tidak mempunyai spora, dan pada uji katalase terdapat gelembung gas (positif). Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Corynebacterium*.

g. Isolat E121

Bakteri endofit saat diamati berbentuk bulat, warna koloni putih keruh, tepiannya rata, elevasinya cembung dan mucoid. Pada pengujian fisiologi dan biokimia diketahui bahwa bakteri endofit ini termasuk gram negatif berbentuk batang dan reaksi oksidatif negatif. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Erwinia*, famili *Enterobacteriaceae*.

h. Isolat E129

Bakteri endofit diamati dibawah mikroskop koloninya berbentuk bulat, berwarna putih bening, tepiannya rata dengan elevasi cembung dan terdapat mucoid. Pengujian fisiologi dan biokimia menunjukkan reaksi gram negatif berbentuk batang, bersifat oksidatif positif, uji fermentasi glukosa negatif, tidak terdapat pigmen fluorescent, reaksi negatif pada media YDC, dan bakteri dapat tumbuh pada media D1M agar. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan dalam genus *Agrobacterium*.

