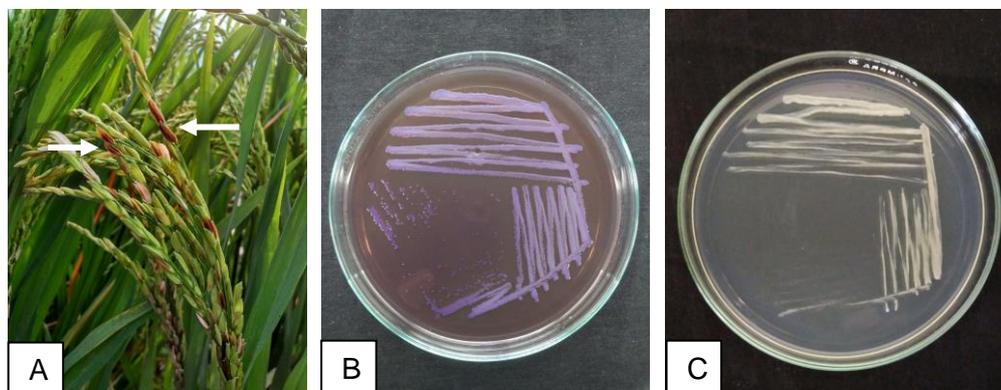


## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Isolasi bakteri penyebab penyakit busuk biji

Hasil eksplorasi bakteri penyebab penyakit busuk biji menunjukkan gabah berwarna coklat kemerahan berawal dari pangkal gabah hingga berwarna abu-abu diujung kulit gabah. Gejala pada tingkat serangan tinggi menyebabkan biji tidak terisi, kulit gabah kering dan berwarna seperti jerami seperti ditunjukkan pada (Gambar 6A). Menurut deskripsi Nandakumar *et al.* (2009) gejala penyakit busuk biji memiliki ciri khas gabah berwarna jerami dengan pangkal berwarna lebih gelap, memiliki garis coklat kemerahan diseluruh gabah antara daerah gelap dan daerah berwarna jerami yang menyebabkan biji tidak terisi.

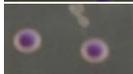
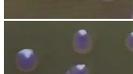


Gambar 6. Gejala dan isolasi bakteri penyebab busuk biji pada beberapa media tumbuh, (A) gejala penyakit busuk biji pada fase generatif asal Pakisaji, (B) pertumbuhan isolat PKA di media S-PG pada 3 hsi, (C) pertumbuhan Isolat PKA di media King's B pada 1 hsi.

Isolasi bakteri busuk biji pada padi di Malang Raya menggunakan media selektif S-PG. Hasil pertumbuhan koloni pada media S-PG ditemukan 18 isolat ditunjukkan pada (Tabel 5). Dari 18 isolat terbagi menjadi 4 karakteristik koloni yang berbeda. Kelompok isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, dan PKS memiliki karakteristik koloni berbentuk bulat, konveks, tepi rata, permukaan halus, berukuran kecil, berwarna ungu dengan tepi transparan (Gambar 6B). Kelompok isolat DAU, KRP, WJK, dan TRN memiliki karakteristik koloni berbentuk bulat, *Umbonate* (memiliki tonjolan ditengah koloni), tepi tidak beraturan, permukaan kasar, berukuran kecil, berwarna ungu. Kelompok isolat PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN memiliki karakteristik koloni berbentuk bulat, konveks, permukaan halus, berukuran sedang, berwarna ungu. Isolat JBG memiliki koloni berbentuk bulat, konveks, tepi rata, permukaan halus, berwarna merah keunguan. Nandakumar *et al.* (2009) melaporkan koloni bakteri *B. glumae*

pada media S-PG memiliki bentuk bulat, permukaan halus, *opalescent* (memiliki warna tepi transparan), konveks, dan berwarna ungu pada inti koloni.

Tabel 5. Morfologi koloni bakteri penyebab penyakit busuk biji pada tanaman padi di media S-PG.

No	Kode isolat	Morfologi koloni				Kenampakan koloni
		Bentuk	Warna	Permukaan	Elevasi	
1	<i>B. glumae</i>	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	(Schaad <i>et al.</i> , 2001)
2	DMP*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
3	PCK*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
4	TMP*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
5	LWG*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
6	KPJ*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
7	PKA*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
8	PKS*	Bulat	Ungu, <i>opalescent</i>	Rata	Konveks	
9	DAU	Bulat	Ungu	Tidak rata	<i>Umbonate</i>	
10	KRP	Bulat	Ungu	Tidak rata	<i>Umbonate</i>	
11	WJK	Bulat	Ungu	Tidak rata	<i>Umbonate</i>	
12	TRN	Bulat	Ungu	Tidak rata	<i>Umbonate</i>	
13	PDM	Bulat	Ungu	Rata	Konveks	
14	BLG	Bulat	Ungu	Rata	Konveks	
15	GDL	Bulat	Ungu	Rata	Konveks	
16	KSB	Bulat	Ungu	Rata	Konveks	
17	SGS	Bulat	Ungu	Rata	Konveks	
18	SKN	Bulat	Ungu	Rata	Konveks	
19	JBG	Bulat	Merah keunguan	Rata	Konveks	

Keterangan : *Umbonate* adalah memiliki tonjolan ditengah koloni, *opalescent* adalah warna tepi transparan, (\*) adalah kelompok isolat diduga bakteri *B. glumae*

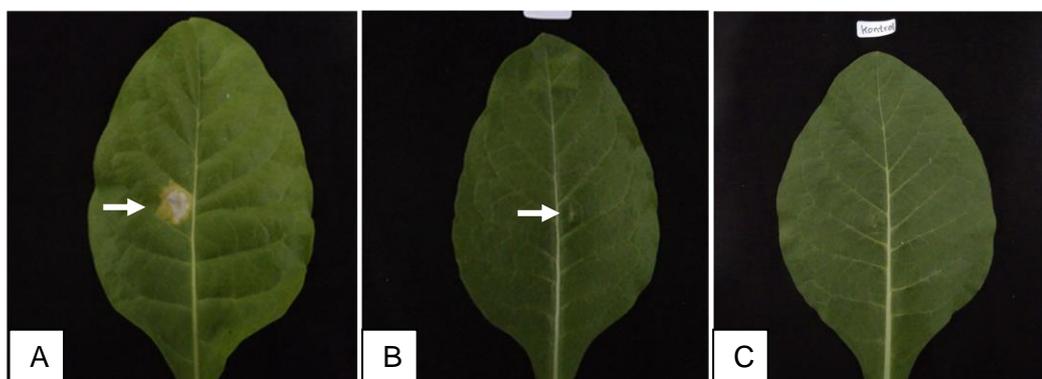
Berdasarkan yang tertulis pada Schaad *et al.* (2001) bakteri *B. glumae* berbentuk bulat, konveks, seluruh koloni berwarna coklat kemerahan adalah tipe-A, berwarna *opalescent* (tepi transparan) dengan warna ungu atau ungu kemerahan pada pusatnya adalah tipe B. Isolat DAU, KRP, WJK, dan TRN tidak memiliki kemiripan dengan koloni bakteri *B. glumae* oleh sebab itu isolat kecamatan tersebut PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN.

Isolasi pada media King's B agar bertujuan untuk purifikasi isolat dan melihat bentuk koloni pada media umum. Isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, PKS, PDM, BLG, KSB, GDL, SGS, dan SKN memiliki bentuk koloni bulat, konveks, tepi rata, permukaan halus, berukuran kecil, berwarna putih kekuningan. Koloni bakteri isolat JBG memiliki bentuk bulat, konveks, tepi rata, permukaan halus, berukuran kecil, berwarna merah dan pada koloni tunggal berwarna putih. Menurut Yuan (2004) karakteristik koloni *B. glumae* pada media King's B agar memiliki bentuk konveks dengan tepi rata, permukaan halus, berwarna abu-abu putih atau krem putih, melepaskan pigmen kuning atau tidak melepaskan pigmen pada media. Isolat JBG memiliki karakteristik morfologi yang berbeda dengan karakteristik morfologi bakteri *B. glumae* oleh sebab itu isolat JBG tidak dilakukan uji ke tahap selanjutnya.

## 4.2. Uji hipersensitif dan patogenisitas

### 4.2.1. Uji hipersensitif

Hasil purifikasi pada media King's B di dapat 13 isolat murni (DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, PKS, PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN). Hasil uji hipersensitif semua isolat menimbulkan gejala hipersensitif, hanya isolat GDL yang tidak menimbulkan gejala hipersensitif.



Gambar 7. Uji hipersensitif beberapa isolat bakteri *B. glumae* ditanaman tembakau pada 3 hsi (A) reaksi positif pada isolat PKS, (B) reaksi negatif pada isolat GDL, (C) perlakuan kontrol.

Daun tembakau yang diinokulasikan isolat GDL (Gambar 7B) tetap berwarna hijau seperti pada perlakuan kontrol. Daun pada isolat PKA dan PKS (Gambar 7A) menimbulkan gejala klorosis dan nekrotik di sekitar daerah inokulasi seperti pada 10 isolat lainnya. Gejala hipersensitif muncul pada 3 hsi, di mulai dengan daerah inokulasi mengalami klorosis kemudian menjadi nekrotik pada 5 hsi. Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang dapat menimbulkan gejala hipersensitif bersifat patogenik. Respon hipersensitif merupakan proses kematian sel yang cepat dan terlokalisasi. Reaksi ini muncul pada tanaman yang terinfeksi saat pengenalan patogen yang merupakan usaha untuk menghambat pertumbuhan patogen. Induksi hipersensitif dan patogenitas dipengaruhi oleh gen *hrp* yang umumnya ditemukan pada bakteri Gram negatif patogen tanaman (Zhu *et al.*, 2000).

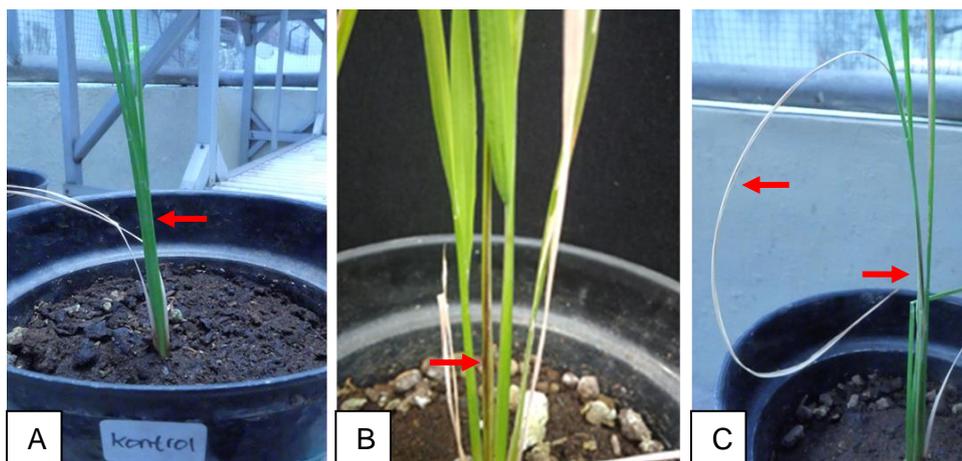
Tabel 6. Hasil uji hipersensitif beberapa isolat bakteri *B. glumae* pada tanaman tembakau

Kode isolat	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Kontrol	-	-	-
DMP*	+	+	+
PCK*	+	+	+
TMP*	+	+	+
LWG*	+	+	+
KPJ*	+	+	+
PKA*	+	+	+
PKS*	+	+	+
PDM	+	+	+
BLG	+	+	+
GDL	-	-	-
KSB	+	+	+
SGS	+	+	+
SKN	+	+	+

Keterangan : (-) reaksi positif hipersensitif, (+) reaksi positif hipersensitif, (\*) adalah kelompok isolat diduga bakteri *B. glumae*

#### 4.2.2. Uji patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan pada tanaman padi pada fase vegetatif, hal ini dilakukan karena bakteri *B. glumae* selain menimbulkan penyakit busuk biji dapat menimbulkan penyakit busuk pelepah (*sheat rot*) pada fase vegetatif. Hasil uji patogenisitas isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS dapat menunjukkan gejala nekrosis berwarna abu-abu dikelilingi warna coklat pada daerah inokulasi dan menyebar secara vertikal pada batang tanaman padi. Pada gejala yang parah menyebabkan daun pisau mengalami kematian sehingga berwarna coklat.



Gambar 8. Uji patogenisitas beberapa isolat bakteri *B. glumae* pada 7 hsi (A) Perlakuan kontrol, (B) gejala isolat PCK menunjukkan skala ++ , (C) gejala isolat PCK menunjukkan skala +++.

Isolat PCK dan DMP menunjukkan gejala dengan tingkat serangan parah dibanding dengan isolat lainnya, ditunjukkan dengan skala “+++” pada (Tabel 6). Gejala patogenisitas yang parah dapat menyebabkan daun pisau menjadi layu dan mengalami kematian seperti pada tanaman padi yang diinokulasikan isolat PCK (Gambar 8B dan 8C). Isolat BLG dan KSB hanya menunjukkan 1 gejala dari 3 ulangan, gejala yang ditunjukkan pada daerah inokulasi nekrotik berwarna abu-abu. Isolat PDM, GDL, SGS, SKN tidak menunjukkan gejala pada tanaman padi seperti pada tanaman padi perlakuan kontrol (Gambar 8A). Menurut Nandakumar *et al.*, (2009) gejala khusus pada pelepah berbentuk panjang vertikal, luka berwarna keabu-abuan dikelilingi oleh tepi berwarna coklat kemerahan gelap.

Tabel 7. Hasil uji patogenisitas beberapa isolat bakteri *B. glumae* pada tanaman padi

Isolat	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Kontrol	-	-	-
DMP*	+	+++	++
PCK*	+++	+++	++
TMP*	+	+	+
LWG*	+	+	+
KPJ*	+	+	+
PKA*	+	+	+
PKS*	+	+	+
PDM	-	-	-
BLG	+	-	-
GDL	-	-	-
KSB	-	+	-
SGS	-	-	-
SKN	-	-	-

Keterangan : (-) tidak menimbulkan gejala, (+) Berwarna kecoklatan di sekitar tempat suntikan, (++) luka berwarna abu-abu berdiameter 1-2 cm, menyebar keatas dan kebawah dari tempat suntikan dengan tepi coklat gelap, (+++) luka menyebar di batang dari tempat suntikan ke dalam daun pisau (*leaf blade*) menjadi berwarna kuning dan nekrotik (Nandakumar *et al.*, 2009), (\*) adalah kelompok isolat diduga bakteri *B. glumae*

### 4.3. Karakterisasi morfologi bakteri

#### 4.3.1. Karakterisasi morfologi bakteri penyebab busuk biji

Pengujian pertumbuhan pada berbagai media bertujuan untuk membedakan bakteri pada tingkat genus serta melihat karakteristik koloni dan respon pertumbuhannya. Setiap genus bakteri memiliki karakteristik koloni yang berbeda. Perbedaan bentuk koloni dan respon pertumbuhan tidak lepas dari sifat bakteri dan media yang digunakan. Hasil karakterisasi bakteri penyebab busuk biji menunjukkan terdapat perbedaan yang ditunjukkan pada (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil karakterisasi morfologi beberapa isolat bakteri *B. glumae* pada berbagai media tumbuh

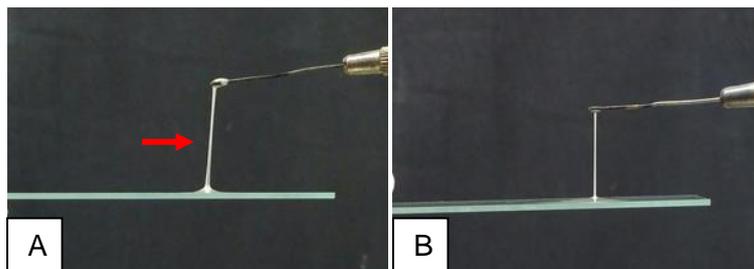
Kode isolat	Uji karakterisasi morfologi				
	Uji Gram	Tes oksidatif-fermentatif	Pigmen fluoresen	Koloni kuning di YDC	Pertumbuhan di D1M agar
DMP*	-	-	-	-	+
PCK*	-	-	-	-	+
TMP*	-	-	-	-	+
LWG*	-	-	-	-	+
KPJ*	-	-	-	-	+
PKA*	-	-	-	-	+
PKS*	-	-	-	-	+
PDM	-	+	TD	TD	TD
BLG	-	+	TD	TD	TD
GDL	-	+	TD	TD	TD
KSB	-	+	TD	TD	TD
SGS	-	+	TD	TD	TD
SKN	-	+	TD	TD	TD
PDM	-	+	TD	TD	TD
<i>Burkholderia</i> sp. (Schaad <i>et al.</i> , 2001)	-	-	-	-	-

Keterangan : (-) reaksi negatif, (+) reaksi positif, (TD) tidak diuji, (\*) adalah kelompok isolat diduga bakteri *B. glumae*

#### 4.3.2. Uji Gram

##### 1. KOH 3%

Pengujian KOH 3 % bertujuan untuk membedakan bakteri patogen tanaman menjadi dua kelompok besar: Gram positif dan Gram negatif. Teknik pengujian KOH 3% dapat digunakan sebagai tes cepat untuk identifikasi awal. Hasil dari uji KOH 3% menunjukkan isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, PKS, PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN membentuk lendir lengket (gel) saat dicampurkan dengan KOH 3%.

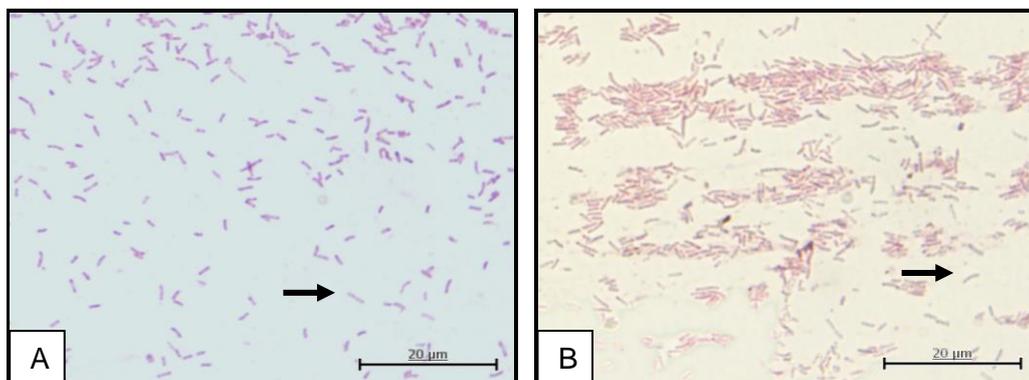


Gambar 9. Uji KOH 3% beberapa isolat bakteri *B. glumae*. (A) isolat KPJ menunjukkan biakan membentuk lendir lengket saat ditarik 2 cm, (B) isolat PCK menunjukkan lendir lengket.

Seperti yang ditunjukkan pada isolat KPJ dan PCK (Gambar 9) setelah dicampurkan dengan KOH 3% selama 20 detik isolat tersebut membentuk lendir lengket (gel) saat jarum ose di tarik setinggi 1 cm. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel mengalami lisis oleh KOH 3% dan melepaskan jaringan DNA yang membuat isolat bakteri menjadi lendir lengket. Menurut Schaad *et al.* (2001) bakteri Gram negatif akan menghasilkan lendir lengket (gel) saat bercampur dengan KOH 3%.

## 2. Pewarnaan Gram

Hasil uji pewarnaan Gram menunjukkan Isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, PKS, PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN berwarna merah hingga jingga seperti pada isolat PKA dan PKS (Gambar 10). Semua isolat memiliki bentuk sel batang dengan ukuran  $0,56-0,67 \times 1,58-2,16 \mu\text{m}$ .



Gambar 10. Pewarnaan Gram b beberapa isolat bakteri *B. glumae* dilihat dari mikroskop (pada perbesaran 100x)

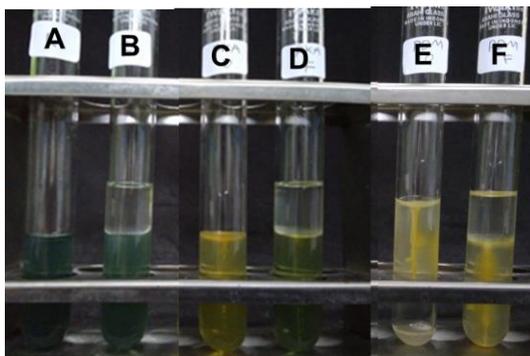
- (A) isolat PKA menunjukkan bentuk sel batang dan warna merah,  
 (B) isolat PKS menunjukkan bentuk sel batang dan warna jingga.

Bakteri genus *Burkholderia* termasuk kedalam kelompok Gram negatif (Schaad *et al.*, 2007). Mengikuti deskripsi dari Urakami *et al.* (1994) bakteri *B. glumae* memiliki karakteristik sel berbentuk batang dengan ukuran  $0,5-0,7 \times 1,5-2,5 \mu\text{m}$ , motil dan mempunyai 2-4 flagella.

#### 4.3.3. Tes oksidatif-fermentatif

Hasil dari uji tes oksidatif-fermentatif menunjukkan bahwa isolat bakteri DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, dan PKS (Gambar 11A) tidak mampu tumbuh pada media kedap udara ditunjukkan dengan warna media tidak berubah warna menjadi kuning pada media yang ditutup parafin. Media yang diinokulasikan isolat PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN (Gambar 11B) berubah warna dari hijau menjadi kuning dalam waktu 24 jam.

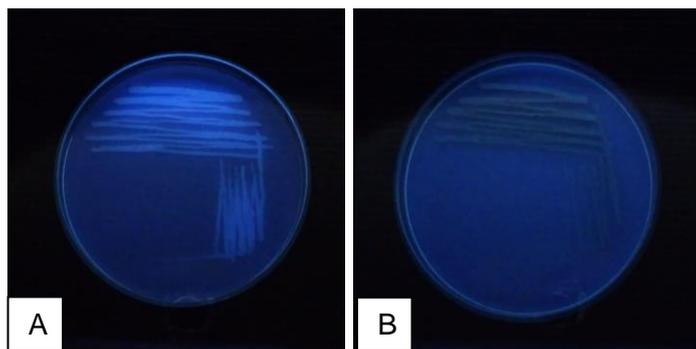
Perubahan warna dari hijau tua menjadi kuning menunjukkan terdapat proses metabolisme bakteri karena penggunaan karbon pada media yang mengandung glukosa, bakteri kemudian memproduksi asam sehingga pH media berubah dan mengakibatkan terjadinya perubahan warna (Suryani, 2012). Menurut Schaad *et al.* (2001) bakteri genus *Burkholderia* tidak mampu tumbuh dalam keadaan anaerob. Isolat PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN dapat tumbuh dalam keadaan anaerob menunjukkan isolat tersebut bukan genus *Burkholderia*, sehingga isolat tersebut tidak dilakukan uji ke tahap selanjutnya.



Gambar 11. Uji tes oksidatif-fermentatif isolat PKA dan PDM. (A) Kontrol tanpa parafin, (B) Kontrol dengan parafin, (C) Isolat PKA tanpa parafin, (D) Isolat PKA dengan parafin, (E) Isolat PDM tanpa parafin, (F) Isolat PDM dengan parafin.

#### 4.3.4. Pigmen fluoresen pada media King's B

Pengujian pigmen fluoresen bertujuan membedakan bakteri dari genus lain dengan bakteri dari genus *Pseudomonas*. Hasil pengujian pigmen fluoresen pada media King's B agar menunjukkan isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS tidak berpendar pada ruang gelap yang disinari oleh sinar ultraviolet pada gelombang 366 nm. Isolat KPJ (Gambar 12A) memiliki warna putih terang saat disinari oleh sinar ultraviolet, sedangkan isolat LWG (Gambar 10B) memiliki warna putih gelap. Hal tersebut dapat diduga isolat LWG mengeluarkan senyawa tertentu yang dapat terlihat lebih gelap.

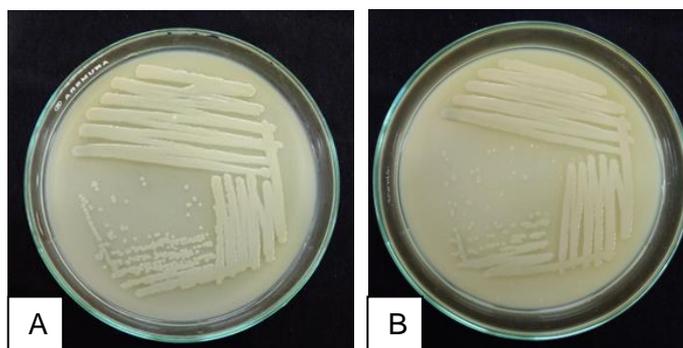


Gambar 12. Pengujian Pigmen fluoresen pada isolat bakteri KPJ dan LWG pada media King's B agar pada 1 hsi (A) isolat KPJ yang tidak melepaskan pigmen kuning (B) isolat LWG melepaskan pigmen kuning atau hijau.

Berdasarkan pernyataan Masnilah *et al.* (2013) bakteri penghasil pigmen fluoresen menghasilkan warna hijau berpendar saat biakan bakteri disinari dengan sinar ultraviolet (UV). Yuan (2004) menyatakan koloni bakteri *B. glumae* yang bersifat patogen dan virulen pada media King's B agar dapat melepaskan pigmen kuning atau hijau yang menunjukkan bahwa mungkin ada racun selain *phytoxin* terkait dengan pigmen kuning. Schaad *et al.* (2001) menyatakan bakteri dengan genus *Burkholderia* tidak dapat memproduksi pigmen fluoresen pada media King's B agar.

#### 4.3.5. Koloni kuning pada media YDC

Berdasarkan Schaad *et al.* (2001) jika hasil uji oksidatif-fermentatif adalah bakteri bersifat aerob, uji selanjutnya adalah uji pertumbuhan koloni kuning media YDC. Jika koloni bakteri bersifat aerob ditumbuhkan pada media YDC memiliki koloni berwarna putih diduga bakteri tersebut merupakan genus *Agrobacterium*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, atau *Ralstonia*.



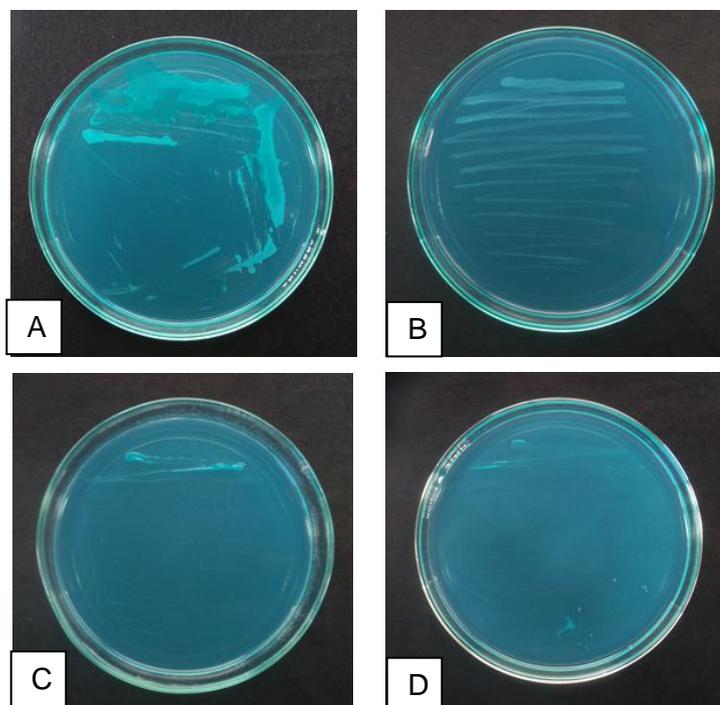
Gambar 13. Uji pertumbuhan koloni kuning pada media YDC isolat bakteri DMP dan PKS. (A) pertumbuhan koloni isolat DMP berwarna putih, (B) pertumbuhan koloni isolat PKS berwarna putih.

Hasil pengujian pertumbuhan koloni pada media YDC isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS memiliki koloni berwarna putih, berbentuk

bulat, konveks, tepi rata, dan permukaan halus seperti pada isolat DMP dan PKS yang ditunjukkan pada (Gambar 13A dan 13B). Menurut Schaad *et al.* (2001) koloni bakteri genus *Burkholderia* tidak berwarna kuning pada media YDC. Koloni bakteri aerob yang berwarna kuning pada media YDC adalah *Xanthomonas* dan *Xylophilus*.

#### 4.3.6. Pertumbuhan pada D1M agar

Pengujian pada D1M Agar menunjukkan isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS dapat tumbuh di media D1M agar pada 4 hsi. Isolat PCK dan KPJ (Gambar 14A dan 14B) menunjukkan pertumbuhan lebih baik dan membentuk koloni lebih banyak daripada isolat LWG dan PKA (Gambar 14C dan 14D) yang menunjukkan pertumbuhan koloni sedikit dan tidak terdapat jejak goresan pada media D1M agar. Berdasarkan Schaad *et al.* (2001) media D1M agar merupakan media selektif untuk bakteri genus *Agrobacterium*. Salah satu komposisi D1M agar sama seperti komposisi media S-PG yaitu  $K_2HPO_4$ , oleh sebab itu semua isolat dapat tumbuh pada media D1M agar tetapi pertumbuhan koloni terhambat. Penambahan sumber P dalam bentuk  $KH_2PO_4$  pada media biakan memberikan pengaruh meningkatkan kepadatan sel terjadi hanya pada awal kultivasi (Subagiyo *et al.*, 2015).



Gambar 14. Pertumbuhan beberapa isolat bakteri *B. glumae* pada media D1M agar. (A) pertumbuhan isolat PCK, (B) pertumbuhan isolat KPJ, (C) pertumbuhan isolat LWG, (D) pertumbuhan isolat PKA.

#### 4.4. Karakterisasi fisiologi dan biokimia bakteri

##### 4.4.1. Karakterisasi secara fisiologi dan biokimia

Bakteri memiliki berbagai aktivitas untuk pertumbuhan dan perbanyakan, setiap bakteri memiliki respon berbeda terhadap nutrisi yang diperoleh dari lingkungan sekitar. Aktivitas biokimia ini dapat diamati secara fisiologi sehingga dapat digunakan untuk proses identifikasi. Pengujian karakterisasi secara fisiologi dan biokimia dalam penelitian ini adalah untuk membedakan bakteri spesies *B. glumae* dengan bakteri *Burkholderia* spesies lainnya. Hasil uji biokimia dan fisiologi memiliki beberapa perbedaan dengan yang dilaporkan Schaad *et al.* (2001) disajikan pada (Tabel 9).

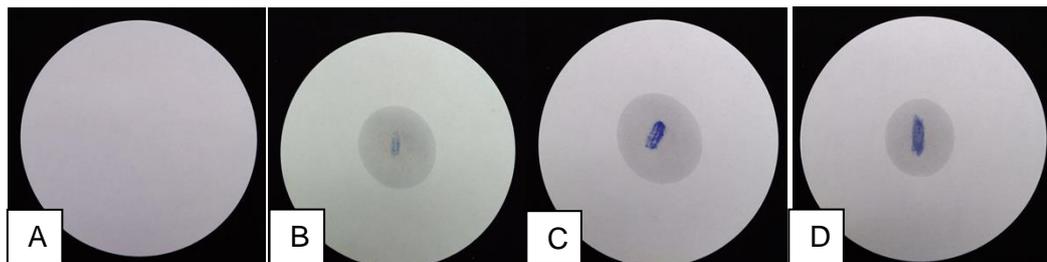
Tabel 9. Hasil uji fisiologi dan biokimia beberapa isolat bakteri penyebab penyakit busuk biji pada padi.

Uji fisiologi dan biokimia	Kode isolat							<i>B. glumae</i> (Schaad <i>et al.</i> , 2001)
	DMP	PCK	TMP	LWG	KPJ	PKA	PKS	
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	ND
Pertumbuhan di pH 4	+	+	+	+	+	+	+	-
Pertumbuhan di pH 8	-	+	+	+	+	+	+	V
Pertumbuhan di pH 9	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan di suhu 40°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Pertumbuhan di NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+	+
Dihidrolisis arginine	-	-	-	-	-	-	-	+
Pencairan gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisis pati	+	+	+	+	+	+	+	-
Pemanfaatan sumber karbon:								
Laktosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukrosa	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (-) reaksi negatif, (+) reaksi positif, (V) 21-71% positif, (ND) tidak diuji

##### 4.4.2. Uji oksidase

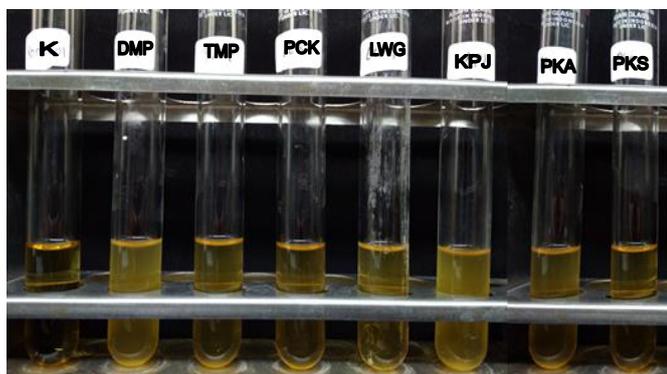
Pengujian oksidase bertujuan untuk mengetahui bakteri dapat memproduksi enzim oksidase atau tidak. Hasil pengujian uji oksidase menunjukkan isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS positif oksidatif (Gambar 15), ditunjukkan dengan biakan berubah menjadi warna ungu setelah dipindahkan pada kertas saring yang telah ditetesi oleh *tetramethyl-p-phenylenediamine dihidroklorida*. Perubahan biakan menjadi warna ungu dalam waktu 40 detik. Menurut Urakami *et al.* (1994) bakteri *B. glumae* dapat memproduksi enzim oksidase dan katalase.



Gambar 15. Uji oksidase beberapa isolat bakteri *B. glumae*. (A) perlakuan kontrol, (B) isolat DMP, (C) isolat PCK, (D) isolat LWG.

#### 4.4.3. Pertumbuhan pada suhu 40°C

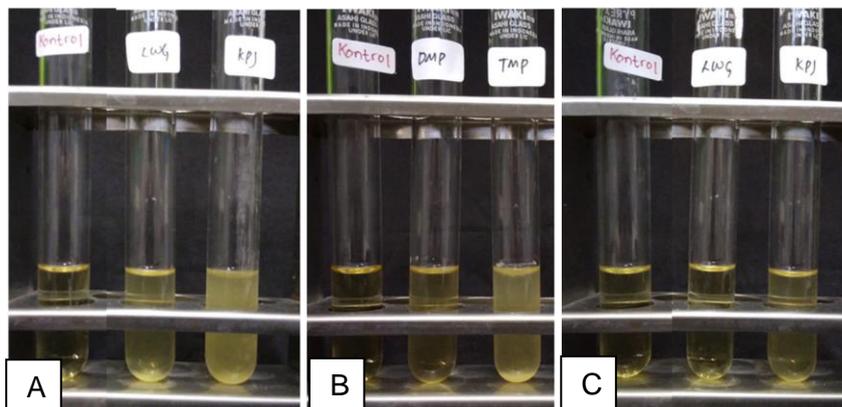
Pengujian pertumbuhan pada suhu 40°C bertujuan untuk membedakan spesies *B. glumae* dengan spesies *Burkholderia* lain. Hasil pengujian suhu 40°C isolat DMP dan KPJ mampu tumbuh dengan baik, ditunjukkan dengan perubahan media menjadi keruh. Isolat TMP, PCK, LWG, PKA, dan PKS mampu tumbuh, terlihat dari media tumbuh lebih keruh dibandingkan dengan perlakuan kontrol tetapi pertumbuhannya tidak sebaik isolat DMP dan KPJ. Schaad *et al.* (2001) menyatakan perubahan media tumbuh menunjukkan adanya aktifitas pertumbuhan bakteri. Urakami *et al.* (1994) melaporkan bahwa bakteri *B. glumae* dapat tumbuh pada suhu 11-40°C tetapi tumbuh optimum pada suhu 30-35°C.



Gambar 16. Pertumbuhan isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA dan PKS pada suhu 40°C

#### 4.4.4. Pertumbuhan pada pH yang berbeda

Seleksi pengujian pH menggunakan pH 4, 8, dan 9 bertujuan untuk membedakan genus *Burkholderia* pada tingkat spesies. Hasil pertumbuhan pada pH 4 menunjukkan isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA dan PKS dapat tumbuh ditunjukkan dengan media tumbuh menjadi keruh seperti pada isolat LWG dan KPJ (Gambar 17A). Isolat TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA dan PKS mampu tumbuh pada pH 8, sedangkan isolat DMP tidak dapat tumbuh pada pH 8 (Gambar 17B).

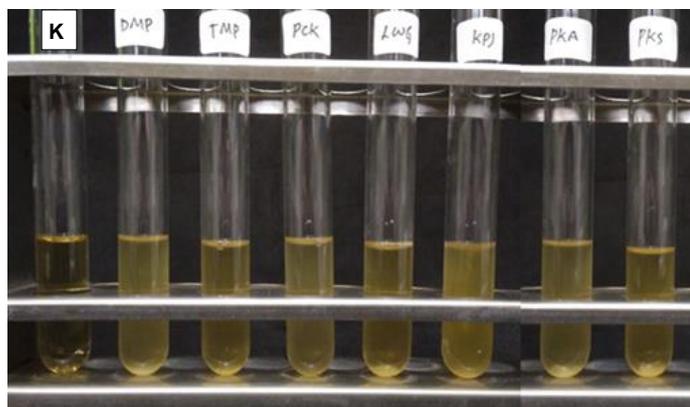


Gambar 17. Pertumbuhan beberapa isolat bakteri *B. glumae* pada pH yang berbeda, (A) adalah pH 4, (B) adalah pH 8, (C) adalah pH 9.

Uji pertumbuhan pada pH 9 menunjukkan isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA dan PKS tidak mampu tumbuh pada pH 9. Schaad *et al.* (2001) menyatakan bakteri genus *Burkholderia* yang dapat tumbuh pada pH 4 adalah *B. cepacia*, *B. gladioli*, dan *B. plantarii*, pada pH 8 adalah spesies *B. cepacia* dan *B. gladioli* tetapi pada spesies *B. glumae* persentase positif sekitar 21-79%, sedangkan pada pH 9 bakteri genus *Burkholderia* tidak mampu tumbuh. Menurut Urakami *et al.* (1994) melaporkan bakteri *B. glumae* tumbuh dengan baik pada kisaran pH 5,0 dan 7,5 pertumbuhan lemah pada pH 4,0 dan 8,0. Pertumbuhan tidak terjadi pada nilai pH di atas 9,0 dan di bawah 3,0. Berdasarkan pernyataan Shaad *et al.* (2001) kemungkinan spesies isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA dan PKS adalah *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. plantarii* atau *B. glumae*.

#### 4.4.5. Pertumbuhan pada kadar NaCl 3%

Hasil dari uji pertumbuhan pada kadar NaCl 3% menunjukan Isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA dan PKS mampu tumbuh pada kadar NaCl 3%. Media tumbuh bakteri terlihat keruh dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

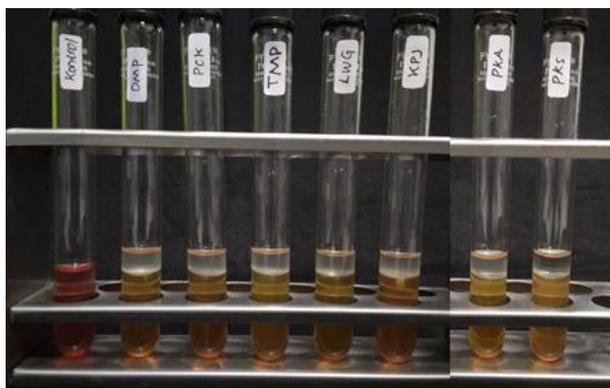


Gambar 18. Pertumbuhan isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA dan PKS pada kadar NaCl 3%.

Menurut Urakami *et al.* (1994) dan Schaad *et al.* (2001) bakteri *B. glumae* dapat tumbuh pada kadar NaCl 3%. Berdasarkan pernyataan Shaad *et al.* (2001) dari kemungkinan spesies *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. plantarii* atau *B. glumae* yang mampu tumbuh dengan baik pada kadar NaCl 3% adalah *B. glumae*.

#### 4.4.6. Pengujian Arginine dihidrolase

Hasil uji arginine dihidrolase menunjukkan hasil yang berbeda dengan karakteristik yang ditunjukkan oleh Schaad *et al.* (2001). Isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS tidak mampu menghasilkan NH<sub>3</sub> pada uji arginine dihidrolase.

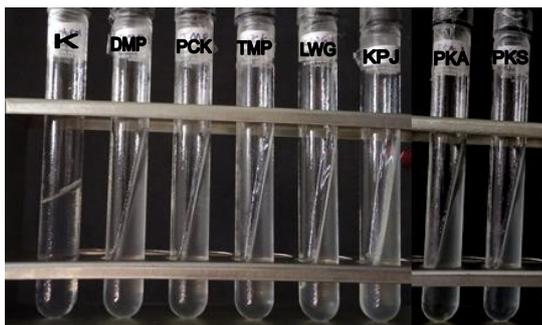


Gambar 19. Pengujian arginine dihidrolase pada isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS.

Hal ini terlihat dari media uji yang tidak berubah warna menjadi warna merah muda. Media uji berubah warna dari jingga menjadi kuning, menunjukkan ke tujuh isolat tidak menghasilkan NH<sub>3</sub> pada uji arginine dihidrolase melainkan asam dari hasil pemanfaatan pepton. Singh dan Vishnavat (2015) melaporkan uji dihidrolisa arginine pada bakteri *B. glumae* memiliki hasil negatif. Hasil uji dihidrolisa arginine kemungkinan terdapat perbedaan karakteristik antar bakteri *B. glumae*. isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS termasuk kedalam kelompok bakteri genus *Burkholderia* yang negative pada uji arginine dihidrolase.

#### 4.4.7. Pencairan gelatin

Pengujian pencairan gelatin terlebih dahulu diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit di lemari pendingin. Hasil pengujian pencairan gelatin menunjukkan isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, dan PKS mampu menghidrolisis gelatin ditunjukkan pada (Gambar 20).. Hal ini ditunjukkan dengan media tetap menjadi cair setelah inkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, sedangkan gelatin akan mencair pada suhu 28°C.



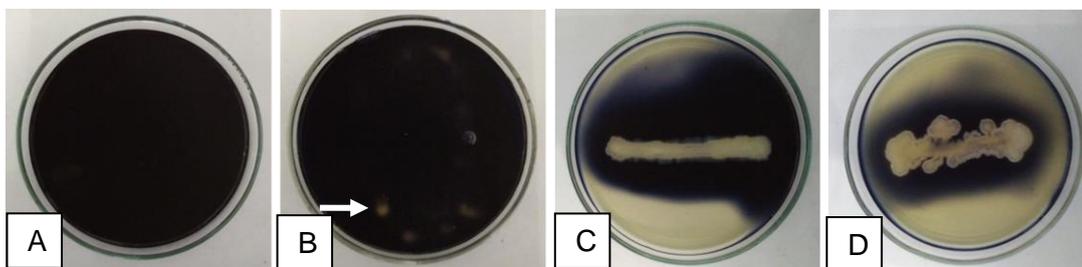
Gambar 20. Uji pencairan gelatin pada isolat bakteri DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, dan PKS,

Keterangan : foto diambil pada saat tabung reaksi dalam keadaan horizontal.

Menurut Singh dan Vishunavat (2015) bakteri *B. glumae* positif dapat menghidrolisis gelatin. Media nutrient agar gelatin tetap menjadi cair pada suhu 4°C menandakan bakteri tersebut positif mampu menghidrolisis gelatin, bakteri yang dapat menghidrolisis gelatin mengeluarkan enzim gelatinase yang memecah gelatin menjadi air sehingga media nutrient agar gelatin menjadi cair pada titik beku gelatin yaitu dibawah suhu 28°C (Cappuccino dan Sherman, 2011).

#### 4.4.8. Hidrolisis pati

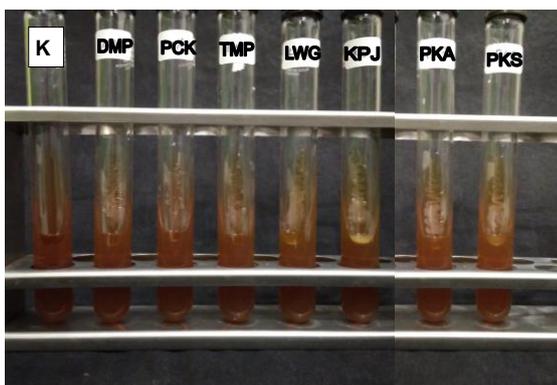
Hasil uji hidrolisa pati menunjukkan isolat DMP, TMP, PCK, LWG, KPJ, PKA, dan PKS dapat menghidrolisa pati, ditunjukkan dengan terdapatnya zona bening pada media yang telah dibanjiri oleh lugol iodine. Zona bening tersebut menandakan pemanfaatan pati oleh isolat bakteri. Isolat TMP menunjukkan sedikit zona bening, berbeda dengan isolat DMP dan PCK yang memiliki zona bening lebih luas. Perbedaan luas zona bening menunjukkan tingkat kemampuan untuk menghidrolisis pati. Bo *et al.* (2008) melaporkan terdapat bakteri *B. glumae* yang dapat menghidrolisis pati. Menurut Schaad *et al.* (2001) bakteri *B. glumae* tidak mampu menghidrolisa pati. Hal ini menunjukkan bahwa antar bakteri *B. glumae* memiliki karakteristik yang berbeda.



Gambar 21. Uji hidrolisis pati beberapa isolat bakteri *B. glumae*. (A) perlakuan kontrol, (B) isolat TMP dengan zona bening kecil, (C) isolat DMP dengan zona bening sedang, (D) isolat PCK dengan zona bening besar.

#### 4.4.9. Pemanfaatan sumber karbon

Hasil pengujian pemanfaatan sumber karbon menunjukkan isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS tidak bisa memanfaatkan sukrosa dan laktosa. Hal ini ditunjukkan media uji tidak berubah seperti perlakuan kontrol. Tidak terdapat perubahan pada media tumbuh yang menunjukkan tidak ada aktifitas pemanfaatan sumber karbon yaitu glukosa, sukrosa, dan laktosa.

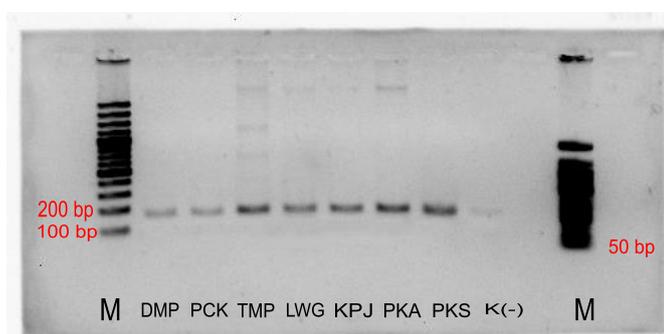


Gambar 22. Pengujian pemanfaatan sumber karbon pada isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS

Berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2011) jika media TSI tidak terjadi perubahan menunjukkan bakteri tersebut tidak dapat memanfaatkan sukrosa dan laktosa. Menurut Schaad *et al.* (2001) bakteri *B. glumae* tidak bisa memanfaatkan sukrosa dan laktosa.

#### 4.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil pengujian PCR menunjukkan isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS berpondar pada kisaran 100 bp hingga 200 bp. Sedangkan perlakuan K(-) mengganti DNA template isolat dengan ddH<sub>2</sub>O. Perlakuan K(-) tidak berpondar menunjukkan tidak ada untaian DNA template yang di amplifikasi.



Gambar 23. Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan primer *B. glumae* (JIBg) dari isolat bakteri DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS. (M) adalah marker, K(-) adalah kontrol negatif.

Isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS berpondar pada 164 bp ditunjukkan pada *band yang* berpondar pada kisaran 100 bp dan 200 bp. Dari

hasil penelitian Lu *et al.*, (2014) primer JIBg Forward (JIBgF) dan JIBg Reverse (JIBgR) berpendar pada 164 bp. Dari perlakuan K(-) menunjukkan jika tidak memiliki DNA template bakteri *B. glumae* tidak terjadi proses amplifikasi DNA dan tidak berpendar. Berdasarkan laporan Lu *et al.*, (2014) melakukan PCR bakteri *B. glumae* menggunakan primer JIBgF dan JIBgR berpendar pada 164 bp.

#### 4.6. Pembahasan umum

Hasil isolasi bakteri penyebab busuk biji pada padi di Malang Raya didapat 18 isolat, tetapi hanya 13 isolat yaitu DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, PKS, PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN yang memiliki kemiripan karakteristik koloni dengan bakteri *B. glumae*. Koloni bakteri *B. glumae* memiliki bentuk bulat, konveks, tepi rata, permukaan halus, berukuran kecil, berwarna ungu (Yuan, 2005). Pengujian hipersensitif semua isolat menunjukkan gejala hipersensitif kecuali isolat GDL. Hasil injeksi dengan inokulum dari isolat tidak menunjukkan perubahan pada daun tembakau dan tidak terjadi nekrosis, artinya bakteri biokontrol tidak patogenik terhadap tanaman tembakau sehingga tidak menyebabkan jaringan kolaps dan mati (Zuraidah, 2013). Pengujian patogenisitas hanya isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS yang menunjukkan gejala patogenisitas. Menurut Nandakumar *et al.*, (2009) bakteri *B. glumae* yang menyebabkan penyakit busuk pelepah memiliki gejala khusus berbentuk panjang vertikal, luka berwarna keabu-abuan dikelilingi oleh tepi berwarna coklat kemerahan gelap.

Isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS memiliki karakteristik morfologi Gram negatif, bersifat aerob, tidak memiliki pigmen fluoresen, koloni putih pada media YDC, sedangkan isolat PDM, BLG, GDL, KSB, SGS, dan SKN memiliki sifat anaerob sehingga tidak dilakukan uji ke tahap selanjutnya. Berdasarkan Schaad *et al.* (2001) karakteristik koloni bakteri *B. glumae* pada media S-PG berbentuk bulat, konveks, seluruh koloni berwarna coklat kemerahan atau berwarna *opalescent* (tepi transparan) dengan warna ungu atau ungu kemerahan pada pusatnya, serta memiliki karakteristik Gram negatif, bersifat aerob, tidak memiliki pigmen fluoresen, negatif pada uji koloni kuning di media YDC, negatif pada pertumbuhan D1M agar.

Pengujian fisiologi dan biokimia hanya diuji isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS menunjukkan tidak memiliki perbedaan antar isolat, tetapi terdapat perbedaan karakteristik dengan Schaad *et al.* (2001) yaitu positif pada

positif pada uji oksidase. Perubahan biakan menjadi warna ungu dalam waktu 40 detik menunjukkan bakteri dapat memproduksi enzim oksidase (Urakami *et al.*, 1994). Isolat tersebut dapat tumbuh pada pH 4 dan pH 8. Menurut Urakami *et al.* (1994) bakteri *B. glumae* tumbuh dengan baik pada kisaran pH 5,0 dan 7,5 pertumbuhan lemah pada pH 4,0 dan 8,0. Hasil pengamatan isolat mampu menghidrolisis pati tetapi negatif pada uji arginine dihidrolase. Terdapat bakteri *B. glumae* yang dapat menghidrolisis pati dan negative pada uji dihidrolisa arginine (Bo *et al.*, 2008, Singh dan Vishunavat, 2015)

Hasil pengujian molekuler menggunakan teknik PCR menunjukkan Isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS adalah bakteri *B. glumae*. Hal tersebut ditunjukkan dengan penggunaan primer JIBgF dan JIBgR pada semua isolat menunjukkan DNA template berpendar di 164 bp. Berdasarkan penelitian Lu *et al.*, (2014) bakteri *B. glumae* akan berpendar pada 164 bp dengan penggunaan primer JIBgF dan JIBgR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode yang paling sensitif dan akurat yang diuji untuk mengidentifikasi patogen bakteri hingga tingkat spesies (Nandakumar *et al.*, 2009). Hasil penelitian karakterisasi bakteri *B. glumae* isolat DMP, PCK, TMP, LWG, KPJ, PKA, dan PKS menunjukkan perbedaan dengan bakteri *B. glumae* di luar negeri.