

**KELIMPAHAN POPULASI BAKTERI FILOSFER, RIZOSFER,
DAN ENDOFIT TANAMAN KEMIRI SUNAN (*REUTEALIS TRISPERMA*
(BLANCO) *AIRY SHAW*), SERTA POTENSINYA
SEBAGAI AGENS BIOKONTROL**

Widi Amaria*¹⁾, Niken Nur Kasim²⁾, dan Abdul Munif³⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar, Sukabumi, Jawa Barat

²⁾Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Andi Djemma, Palopo

³⁾Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

*)e-mail : amariawidi@gmail.com

Ringkasan

Tanaman kemiri sunan (*Reutealis trisperma* (Blanco) *Airy Shaw*) merupakan tanaman potensial yang sebagai penghasil minyak nabati. Interaksi tanaman kemiri sunan dengan mikroba ditunjukkan dari potensinya sebagai sumber mikroba yang bermanfaat, baik berasal dari filosfer, rizosfer, dan endofit. Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Nematologi, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor, pada bulan Februari sampai Mei 2018. Penelitian meliputi (1) isolasi dan pemurnian bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit; (2) uji keamanan hayati, yaitu uji hemolisis dan hipersensitif; (3) karakterisasi isolat bakteri, yaitu uji Gram, pelarut fosfat, dan kitinolitik; serta (4) uji antibiosis sebagai agens biokontrol terhadap patogen *Fusarium oxysporum*. Hasil isolasi bakteri dari tanaman kemiri sunan diperoleh sebanyak 35 isolat, yang terdiri dari filosfer 12, rizosfer 13, dan endofit 10. Kelimpahan populasi tertinggi adalah bakteri filosfer $75,9-82,0 \times 10^4$ cfu/ml. Pengujian keamanan hayati diperoleh informasi sebanyak 9% isolat bakteri berpotensi sebagai patogen mamalia dan 47,2% merupakan patogen tanaman sebesar 47,2%. Hasil uji Gram menunjukkan Gram positif lebih dominan (58,3%) dibandingkan dengan Gram negatif (41,6%). Isolat-isolat bakteri yang diperoleh belum menunjukkan potensinya sebagai pelarut fosfat dan kitinase, namun sebagai agens biokontrol terhadap patogen *F. oxysporum* penyebab penyakit layu pada tanaman tomat. Reaksi antibiosis dengan daya hambat tinggi adalah isolat bakteri endofit (b dan d), yaitu 72,5% dan 55%, sedangkan bakteri rizosfer (u) sebesar 60%, semuanya adalah Gram positif.

Kata kunci: bakteri endofit, filosfer, rizosfer, biokontrol, karakterisasi

**ABUNDANCE POPULATION OF PHYLLOSHERE, RHIZOSPHERE, AND
ENDOPHYTES BACTERIA FROM PHILIPPINE TUNG (*REUTEALIS TRISPERMA*
(*BLANCO*) AIRY SHAW) AND ITS POTENTIAL AS BIOCONTROL AGENTS**

Abstract

*Philippine tung (Reutealis trisperma (Blanco) Airy Shaw) is a potential plant that produces biofuel. The interaction of philippine tung with microbes was shown by their potential as beneficial microbial sources, both from the phyllosphere, rhizosphere, and endophytes. The experiment was conducted at the Nematology Laboratory, Department of Plant Protection, Bogor Agricultural University, from February to May 2018. The research included (1) isolation and purification of phyllosphere, rhizosphere, and endophytic bacteria; (2) biosafety test: hemolysis and hypersensitivity tests; (3) characterization of bacterial isolates, i.e Gram, phosphate solvent, and chitinolytic; and (3) antibiosis test as a biocontrol agent for the *Fusarium oxysporum*. The results of bacterial isolation from philippine tung plants were obtained as many as 35 isolates, consisting of phyllosphere 12, rhizosphere 13, and endophytes 10. The highest population abundance was phyllospheric bacteria 75.9–82.0 x 10⁴ cfu/ml. Biosafety testing obtained information as many as 9% of potential bacterial isolates as mammalian pathogens and 47.2% planted pathogens of 47.2%. Gram test results showed Gram-positive was more dominant (58.3%) than Gram-negative (41.6%). The bacterial isolates obtained have not shown their potential as phosphate and chitinase solvents, but as a biocontrol agent against pathogenic *F. oxysporum* causing wilt in tomato plants. Antibiotic reactions with high inhibitory capacity were endophytic bacteria (b and d) isolates, which were 72.5% and 55%, while the rhizosphere bacteria (u) were 60%, all of them were Gram-positive.*

Keywords: endophytic bacteria, filosphere, rhizosphere, biocontrol, characterization

PENDAHULUAN

Kemiri sunan (*Reutealis trisperma* (Blanco) *Airy Shaw*) merupakan salah satu tanaman yang sangat potensial sebagai penghasil minyak nabati (Heyne, 1987). Kemiri sunan hingga saat ini belum menjadi komoditas yang diperdagangkan, namun memiliki nilai ekonomi tinggi karena sedang dikembangkan menjadi sumber bahan baku biodiesel. Selain bermanfaat sebagai biofuel, tanaman kemiri sunan juga banyak dimanfaatkan untuk tanaman naungan, misalnya kopi. Sampai saat ini belum terdapat laporan tentang patogen yang menginfeksi tanaman kemiri sunan, demikian pula dengan keragaman mikrob non patogen, baik filosfer, rizosfer, maupun endofit. Oleh karena itu, tanaman kemiri sunan berpotensi sebagai sumber mikrob

nonpatogen untuk mendukung kesehatan tanaman.

Kesehatan tanaman dipengaruhi oleh interaksi antara mikrob dan tanaman yang terjadi secara terus menerus. Jenis interaksi antara lain simbiosis, mutualisme, komensalisme, dan antagonisme. Di samping sebagai patogen, mikrob non patogen memberikan banyak manfaat bagi tanaman, antara lain meningkatkan ketahanan tanaman terhadap hama dan penyakit, toleransi terhadap lingkungan yang kurang mendukung, dan pertumbuhan tanaman. Bakteri sebagai salah satu mikrob non patogen juga mempunyai peranan penting secara langsung sebagai plant growth dan tidak langsung sebagai plant health bagi tanaman. Potensi sebagai plant health (agens biokontrol), bakteri non patogen

mempunyai beberapa mekanisme penting. Menurut Cook dan Baker (1983), mekanisme yang banyak digunakan, yaitu antibiosis, kompetisi, parasitisme, induksi ketahanan, dan peningkatan pertumbuhan tanaman.

Bakteri non patogen yang bermanfaat bagi tanaman sangat berlimpah jumlahnya, terutama yang mudah diperoleh baik dari filosfer (daun), rizosfer (daerah di sekitar perakaran), maupun endofit (jaringan tanaman). Bakteri filosfer dapat berperan untuk meningkatkan produksi tanaman (Vorholt, 2012; Reisberg et al., 2013). Peran penting bakteri rizosfer terlibat dalam proses pembusukan, humifikasi, dan mineralisasi (Rao, 2007; Egamberdieva, 2008). Sementara itu, bakteri endofit merupakan bakteri saprofit yang hidup dan berasosiasi dengan jaringan tanaman tanpa menimbulkan suatu gejala penyakit. Keberadaan bakteri-bakteri endofit di dalam jaringan tanaman selain berperan dalam perbaikan pertumbuhan tanaman, dengan menghasilkan zat pemacu tumbuh (IAA, giberelin, dan sitokinin), memfiksasi nitrogen, memobilisasi fosfat, juga dapat meningkatkan pertahanan tanaman terhadap penyakit melalui induksi ketahanan. Induksi ketahanan tanaman dengan memproduksi senyawa antimikrob, enzim, asam salisilat, dan senyawa sekunder lainnya (Feng et al. 2006; Doty 2011; Munif et al. 2012; Gusmaini 2014).

Bakteri non patogen dari filosfer, rizosfer, maupun endofit sudah banyak dimanfaatkan antara lain sebagai agens biokontrol pada tanaman lain. Kurniawati et al. (2015) melaporkan bahwa empat isolat asal rizosfer dan endofit padi (*Chromobacterium* sp. MWU328, *Streptomyces* sp. Antag 1, *Kitasatospora nipponensis* strain H2-4, dan *Bacillus nealsonii* strain F22, mampu memproduksi siderofor dan menghambat pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secara *in vitro* sebesar 66,61%. Penelitian yang berbeda dari Jatnika et al. (2013) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. dan

Pseudomonas sp. dapat menekan penyakit bulai dan meningkatkan pertumbuhan tanaman jagung.

Potensi bakteri non patogen sangat penting untuk diketahui pada tanaman kemiri sunan disebabkan masih terbatasnya informasi ilmiah tentang keberadaan bakteri non patogen yang mendukung pertumbuhan dan kesehatan tanaman. Selain itu diperlukan pemanfaatan dan pengembangan ke depan baik untuk tanaman kemiri sunan maupun tanaman lainnya. Oleh karena itu diperlukan eksplorasi, isolasi, karakterisasi, dan seleksi untuk memberikan informasi tentang kelimpahan serta potensi bakteri non patogen asal kemiri sunan sebagai agens biokontrol terhadap patogen.

Penelitian bertujuan mengetahui kelimpahan populasi, karakterisasi bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit dari tanaman kemiri sunan, serta potensinya sebagai agens biokontrol.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Pemurnian Bakteri Filosfer, Rizosfer, dan Endofit

Bakteri filosfer diisolasi dari daun kemiri sunan, bakteri rizosfer diisolasi dari tanah di sekitar perakaran kemiri sunan, dan bakteri endofit diisolasi dari akar kemiri sunan. Sampel daun, tanah, dan akar ditimbang sebanyak 1 gram. Sampel daun dan tanah, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi air steril 10 ml, divorteks, kemudian dibuat suspensi seri pengenceran hingga 10^{-4} dan 10^{-5} . Sampel dari endofit akar disterilisasi permukaan dengan NaOCl selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, kemudian dibilas dengan air steril selama 2 menit. Pembilasan dilakukan dua kali. Sampel akar yang telah disterilisasi, dihancurkan menggunakan mortar di dalam laminar flow. Selanjutnya, dibuat suspensi seri pengenceran hingga 10^{-4} dan 10^{-5} .

Suspensi dari sampel daun, tanah, dan akar sebanyak 0,1 mL dari seri pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} , diteteskan pada media TSA 20% dan King's B 20% di dalam petridish, kemudian diratakan dengan L glass. Media Pikovskaya 20% digunakan untuk isolasi dari sampel tanah dan akar. Selanjutnya, diisolasi selama 24 dan 48 jam. Pengamatan meliputi kelimpahan populasi bakteri (cfu/*colony forming unit*) dengan menghitung jumlah koloni bakteri yang terbentuk pada media dan dibedakan berdasarkan bentuk dan warna. Setiap koloni bakteri yang memiliki bentuk dan warna yang berbeda, dimurnikan menggunakan tusuk gigi steril dengan digoreskan pada masing-masing media 100% (TSA, King's B, dan Pikovskaya) dan diberi kode untuk masing-masing isolat.

Uji Keamanan Hayati

Uji keamanan hayati dilakukan untuk memisahkan koleksi isolat bakteri endofit yang memiliki potensi sebagai patogen mamalia dan tanaman. Pengujian yang dilakukan meliputi uji aktivitas hemolisis (agar darah) dan uji hipersensitif.

a. Uji aktivitas hemolisis

Uji aktivitas hemolisis mengikuti metode Zimbro dan Power (2009). Isolat bakteri dari biakan murni ditumbuhkan pada media agar darah, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Parameter pengamatan adalah zona hemolisis, merupakan zona bening yang jelas batasnya di sekitar koloni bakteri. Zona bening menunjukkan alfa-hemolisis, jika agak gelap adalah beta-hemolisis. Isolat bakteri yang menunjukkan kedua zona tersebut tidak digunakan untuk uji selanjutnya karena positif patogen mamalia atau berbahaya bagi mamalia.

b. Uji hipersensitif

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui potensi patogenitas isolat bakteri. Metode yang digunakan mengikuti Klement dan Goodman (1967). Koleksi

isolat bakteri yang diperoleh ditumbuhkan pada media cair NB 100% dan diinkubasi selama 48 jam dengan *orbital shaker*. Suspensi bakteri diinjeksikan dengan menggunakan suntikan pada bagian bawah daun tembakau yang berbeda ruas untuk masing-masing suspensi bakteri. Setiap isolat bakteri yang diinjeksikan diberikan tanda dengan label, dan diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap gejala nekrosis pada setiap ruas daun yang diinjeksikan suspensi bakteri. Gejala nekrosis menunjukkan isolat bakteri positif berpotensi sebagai patogen tanaman.

Karakterisasi Isolat Bakteri

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologi bakteri. Pengujian yang dilakukan meliputi uji Gram, uji kitinolitik, dan uji aktivitas pelarut fosfat.

a. Uji Gram

Uji Gram dilakukan dengan larutan KOH 3%, untuk mengetahui sifat Gram bakteri yang telah dikoleksi, positif atau negatif. Larutan KOH 3% diteteskan pada plastik tebal, sebanyak sejumlah isolat yang akan diuji. Koloni bakteri diambil dengan tusuk gigi steril, dicampurkan dengan larutan KOH 3%, kemudian diangkat. Pengamatan dilakukan terhadap terbentuk tidaknya lendir dari campuran larutan KOH dan isolat bakteri. Jika terbentuk lendir menunjukkan Gram negatif, dan sebaliknya.

b. Uji aktivitas pelarut fosfat

Uji aktivitas pelarut fosfat dilakukan pada media Pikovskaya. Isolat bakteri dari biakan murni diambil dengan tusuk gigi steril, digoreskan pada media Pikovskaya, diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Parameter yang diamati adalah ada tidaknya zona bening di sekitar koloni bakteri.

c. Uji kitinolitik

Media uji yang digunakan adalah media kitin. Koloni bakteri diambil dengan

tusuk gigi steril, digoreskan pada media kitin padat, diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Pengamatan dilakukan terhadap ada tidaknya zona bening di sekitar koloni bakteri (Hariprasad *et al.*, 2011 dalam Nursalim, 2017).

Uji Antibiosis Isolat Bakteri terhadap Cendawan Patogen *F. oxysporum*

Uji antibiosis bertujuan mengetahui potensi isolat bakteri sebagai agens biokontrol untuk mengendalikan patogen tanaman. Pengujian antagonis dilakukan secara *dual culture* terhadap cendawan patogen *Fusarium oxysporum* pada tanaman tomat dengan media PDA sesuai metode Fokkema (1973). Media PDA pada petridish dibagi menjadi 4 bagian yang sama, kemudian 1 bulatan koloni isolat *F. oxysporum* diletakkan di tengah media. Koloni isolat bakteri yang berbeda digoreskan dengan tusuk gigi steril pada setiap 4 bagian secara horisontal. Perlakuan kontrol hanya diletakkan isolat *F. oxysporum* tanpa isolat bakteri. Selanjutnya, diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan dengan mengukur jari-jari pertumbuhan *F. oxysporum* untuk mengetahui daya hambat masing-masing isolat bakteri. Persentase penghambatan (P) dihitung dengan rumus:

$$P = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

R1, jari-jari pertumbuhan patogen pada perlakuan kontrol (cm); R2, jari-jari pertumbuhan patogen yang berhadapan dengan isolat bakteri (cm).

HASIL

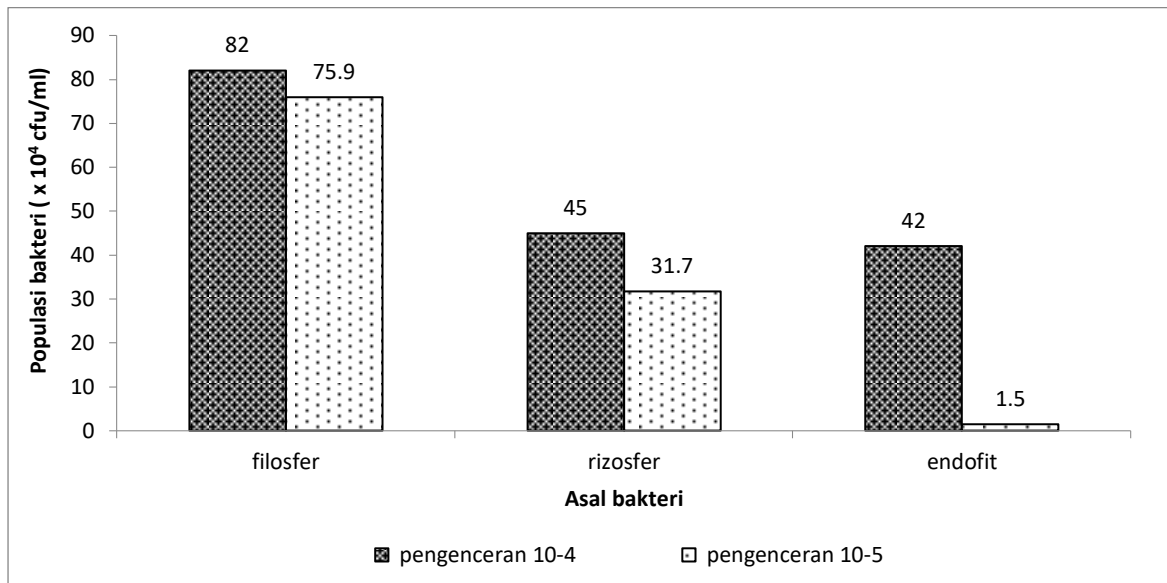
Kelimpahan Populasi Bakteri Endofit, Rizosfer, dan Filosfer

Berdasarkan hasil pengamatan pada Tabel 1, jumlah isolat bakteri yang diperoleh sebanyak 35, yang terdiri dari filofiler 12, rizosfer 13, dan endofit 10. Sementara itu, jumlah populasi bakteri filofiler, rizosfer, dan endofit dari tanaman kemiri sunan menunjukkan bahwa pada media Kings B untuk kedua pengenceran, diperoleh populasi bakteri $0,9 - 76,0 \times 10^4$ cfu/ml, TSA $0,2 - 30, \times 10^4$ cfu/ml, dan Pikovskaya $0,1 \times 10^4$ cfu/ml. Pada media Kings B, bakteri filofiler tumbuh lebih banyak, yaitu $76,0 \times 10^4$ cfu/ml dan $65,1 \times 10^4$ cfu/ml dibandingkan rizosfer dan endofit. Sebaliknya, pada media TSA dan Pikovskaya yang dominan tumbuh adalah bakteri rizosfer, masing-masing sebesar $11,0 - 30,4 \times 10^4$ cfu/ml dan $0,4 - 16,0 \times 10^4$ cfu/ml (Tabel 1). Hal ini membuktikan bahwa kelimpahan populasi bakteri dipengaruhi oleh media tumbuh, jenis tanaman, dan asal isolat, apakah filofiler (permukaan daun), rizosfer (tanah), maupun endofit (akar).

Tabel 1. Jumlah isolat dan populasi bakteri filofiler, rizosfer, dan endofit pada setiap media tumbuh dan tingkat pengenceran sampel

Asal bakteri	Jumlah isolat bakteri	Populasi bakteri pada jenis media dan tingkat pengenceran (x 10 ⁴ cfu/ml)					
		King's B		TSA		Pikovskaya	
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Filosfer	12	76,0	65,1	6,0	10,8	-	-
Rizosfer	13	18,0	0,9	11,0	30,4	16,0	0,4
Endofit	10	25,0	1,2	10,0	0,2	7,0	0,1

Keterangan : - , tidak dilakukan



Gambar 1. Perbandingan populasi bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit dari tanaman kemiri sunan

Kelimpahan populasi tertinggi dari ketiga media pada kedua pengenceran adalah bakteri filosfer sebesar 82×10^4 cfu/ml dan $75,9 \times 10^4$ cfu/ml, selanjutnya diikuti oleh rizosfer, serta yang terendah adalah endofit, sebesar 42×10^4 cfu/ml dan $1,5 \times 10^4$ cfu/ml (Gambar 1). Keadaan ini dapat dijelaskan bahwa bakteri endofit lebih sedikit dibandingkan dengan rizosfer dan filosfer karena pada saat isolasi dari jaringan tanaman, bakteri endofit *culturable* dan *unculturable*. Sebagian dapat dikulturkan pada media, sebagian lain tidak dapat atau sulit dikulturkan. Walaupun demikian, sebenarnya telah diketahui bahwa bakteri endofit jumlahnya berlimpah, hampir semua bagian tanaman tidak bebas dari endofit.

Keamanan Hayati Isolat Bakteri

a. Aktivitas Hemolisis

Berdasarkan Tabel 2, sebanyak 9% isolat bakteri (g, v, dan ab) menunjukkan reaksi positif hemolisis, sedangkan dominan 91% isolat negatif. Reaksi positif hemolisis diperlihatkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

b. Respon Hipersensitif

Hasil pengamatan menunjukkan sebanyak 47,2% isolat bakteri positif patogen tanaman, sedangkan 52,7% negatif (Tabel 3). Isolat bakteri yang bereaksi positif patogen ditunjukkan dengan terbentuknya gejala nekrosis, sedangkan yang negatif tidak terbentuk nekrosis. Gejala nekrosis merupakan hasil dari respon hipersensitif yang dihasilkan tanaman. Dalam hal ini, tanaman tembakau digunakan sebagai tanaman indikator untuk menguji isolat-isolat bakteri yang merupakan kelompok patogen tanaman agar dapat diseleksi untuk tidak digunakan lagi pada uji lanjutan.

Respon hipersensitif dari tanaman tembakau terjadi sangat cepat 24–48 jam, karena pada saat daun terinfeksi bakteri, tanaman segera melakukan pertahanan diri dengan melokalisasi *infection site*. Oleh karena itu, yang menunjukkan gejala nekrosis pada tempat yang diinokulasi. Tiga belas isolat bakteri lainnya yang tidak menunjukkan zona bening merupakan bakteri non patogen.

Tabel 2. Uji hemolisis isolat bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit

No	Kode isolat	Zona bening	No	Kode isolat	Zona bening
1	a	-	19	s	-
2	b	-	20	t	-
3	c	-	21	u	-
4	d	-	22	v	+
5	e	-	23	w	-
6	f	-	24	x	-
7	g	+	25	y	-
8	h	-	26	z	-
9	i	-	27	aa	-
10	j	-	28	ab	+
11	k	-	29	ac	-
12	l	-	30	ad	-
13	m	-	31	ae	-
14	n	-	32	af	-
15	o	-	33	ag	-
16	p	-	34	ai	-
17	q	-	35	aj	-
18	r	-			

Keterangan: (+) patogen mamalia, (-) non patogen

Tabel 3. Uji hipersensitif isolat bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit

No	Kode isolat	Filosfer	Rizosfer	Endofit	No	Kode isolat	Filosfer	Rizosfer	Endofit
1	b			-	14	t		+	
2	c			-	15	u	-	-	
3	d			-	16	w	-		
4	h		-		17	y	-	-	
5	i		+	+	18	z	-	-	
6	j	-	-		19	aa	+		
7	k			-	20	ac	+		
8	l	+	+		21	ad	+		+
9	m			+	22	ae	+		
10	n	-	-	-	23	af			+
11	p		-		24	ag			+
12	r	+	+		25	ai		+	
13	s		-		26	aj		+	

Keterangan: (+) patogen tanaman, (-) non patogen

Karakterisasi Isolat Bakteri

a. Uji Gram

Hasil pengamatan uji Gram diperoleh bahwa jumlah bakteri Gram positif (58,3%) lebih dominan dibandingkan dengan Gram negatif (41,6%). Metode uji Gram menggunakan KOH disebabkan

lebih mudah dan praktis dibandingkan dengan pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis, sedangkan Gram negatif memiliki lemak tebal dan ber dinding sel tipis yang berada di ruang periplasma. Larutan KOH menyerang lemak (bilayer

lipid) dan membuat sel bakteri Gram negatif pecah, sedangkan Gram positif tidak terpengaruh (Chandra dan Mani, 2011).

b. Aktivitas Pelarut Fosfat

Hasil pengamatan menunjukkan isolat bakteri filofser, rizosfer, dan endofit tidak menghasilkan zona bening (negatif) sehingga tidak mempunyai aktivitas pelarut fosfat. Menurut Saparatka (2003), bakteri pelarut fosfat adalah bakteri yang berperan dalam proses mineralisasi

senyawa P organik menjadi P anorganik dan meningkatkan fosfat tersedia. Selain dapat menghasilkan enzim fosfatase juga dapat mengeluarkan asam-asam organik, yaitu asam sitrat, glutamat, suksinat, tartarat, format, asetat, propionat, laktonat, glikonat dan fumarat (Rao, 1994). Bakteri pelarut fosfat antara lain kelompok *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus* sp., *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Escherichia freundii*, *Cunninghamella*, *Brevibacterium* spp., *Serratia* spp., *Alcaligenes* spp., *Achromobacter* spp., dan *Thiobacillus* sp.

Tabel 4. Uji gram isolat bakteri filofser, rizosfer, dan endofit

No	Kode Isolat	Filosfer	Rizosfer	Endofit	No	Kode Isolat	Filosfer	Rizosfer	Endofit
1	b			+	14	t		+	
2	c			+	15	u	+	+	
3	d			+	16	w	+		
4	h		+		17	y	+	+	
5	i		-	-	18	z	+	+	
6	j	-	-		19	aa	-		
7	k			-	20	ac	-		
8	l	-	-		21	ad	-		-
9	m			+	22	ae	-		
10	n	+	+	+	23	af			-
11	p		+		24	ag			-
12	r	+	+		25	ai		+	
13	s		+		26	aj		-	

Keterangan: - gram negatif, + gram positif

c. Aktivitas Kitinolitik

Hasil pengamatan menunjukkan isolat bakteri filofser, rizosfer, dan endofit tidak menghasilkan zona bening (negatif) sehingga tidak mempunyai aktivitas kitinolitik. Uji kitinolitik digunakan untuk mengetahui dan menyeleksi isolat bakteri yang mampu mensekresikan enzim kitinase sehingga dapat berpotensi dalam menghambat patogen yang mempunyai dinding sel kitin dengan cara mendegradasi kitin.

Pratiwi et al. (2015) mengemukakan bahwa kitinase adalah enzim yang mengatalis pemecahan senyawa polimer kitin pada ikatan β -1,4 glikosidik. Enzim

ini dihasilkan oleh bakteri dan organisme lainnya dan telah banyak digunakan sebagai agens biokontrol karena dapat mendegradasi dinding sel patogen yang tersusun dari kitin seperti pada cendawan.

Aktivitas Antibiosis Isolat Bakteri terhadap Cendawan Patogen F. oxysporum

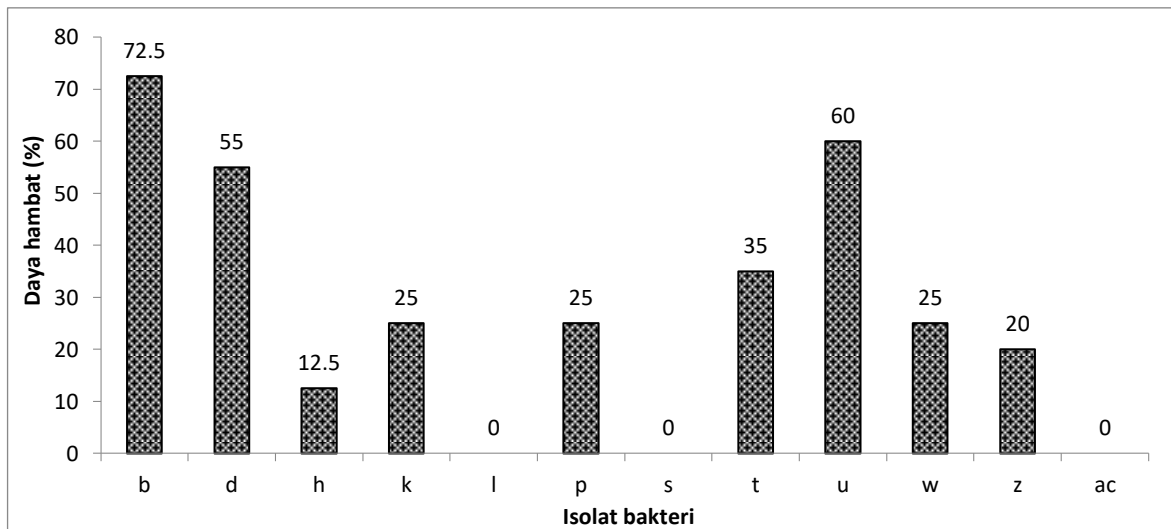
Hasil uji antibiosis 12 isolat bakteri terhadap cendawan patogen *F. oxysporum* tersaji pada Gambar 2, menunjukkan bahwa kemampuan penghambatan isolat bakteri sangat bervariasi. Sembilan isolat bereaksi menghambat perkembangan koloni *F. oxysporum*, yaitu daya hambat

20,0–72,5%, sedangkan 3 isolat tidak membentuk zona hambatan. Di antara 9 isolat bakteri, kode isolat b, u, dan d, menghasilkan daya hambat di atas 50%. Isolat b dengan daya hambat tertinggi 72,5%, isolat u sebesar 60%, dan d sebesar 55%.

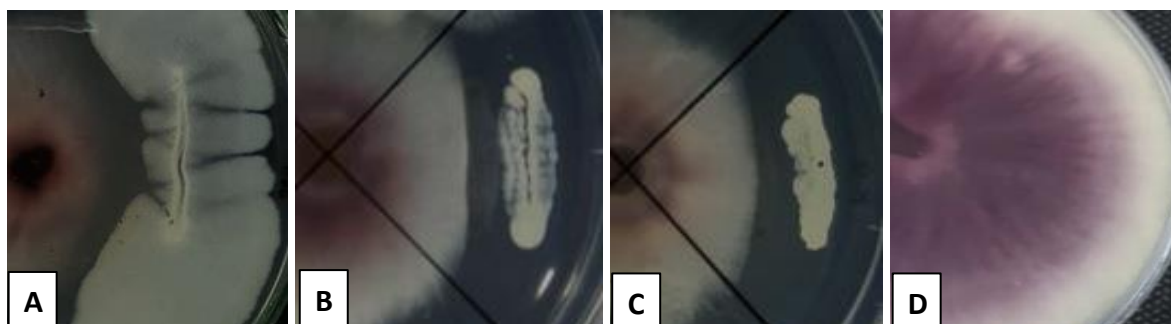
Ketiga isolat bakteri yang mempunyai daya hambat tertinggi diduga dengan mekanisme antibiosis. Penghambatan diperlihatkan dengan adanya zona hambat antara patogen dan isolat bakteri. Selain itu, terdapat perubahan warna pada koloni patogen yang berhadapan dengan isolat bakteri, jika dibandingkan dengan kontrol. Koloni isolat b dan u, terjadi perubahan

warna menjadi merah muda orange sampai agak coklat pada bagian tengah, sedangkan isolat d menjadi ungu tua. Perubahan warna tersebut diduga karena adanya antibiotik yang dikeluarkan oleh isolat bakteri dalam menghambat perkembangan koloni patogen. Perubahan warna akibat perbedaan pigmen yang dihasilkan oleh isolat bakteri (Gambar 3).

Isolat bakteri b dan d berasal dari endofit akar tanaman kemiri sunan, sedangkan u dari sampel tanah rizosfer. Ketiga isolat tersebut berpotensi sebagai agens biokontrol untuk mengendalikan patogen *F. oxysporum* pada tanaman tomat.



Gambar 2. Daya hambat isolat bakteri terhadap patogen *F. oxysporum*



Gambar 3. Daya hambat isolat bakteri terhadap patogen *F. oxysporum* (A) b, (B) d, (C) u, dan (D) kontrol

PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri dari tanaman kemiri sunan diperoleh sebanyak 35 isolat, yang terdiri dari filosfer 12, rizosfer 13, dan endofit 10 isolat. Kelimpahan populasi tertinggi adalah bakteri filosfer, selanjutnya rizosfer, serta yang terendah adalah endofit. Interaksi mikroba dan tanaman yang melibatkan sejumlah mikroba bermanfaat, dalam hal ini adalah bakteri gram positif dan negatif yang berperan penting sebagai agens hayati untuk mengendalikan patogen tanaman. Kelimpahan dan keragaman populasi bakteri filosfer, rizosfer, maupun endofit dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik antara lain genotipe, varietas, umur tanaman, dan jenis bakteri, sedangkan faktor abiotik meliputi aplikasi pestisida, jenis tanah, pemupukan, kandungan bahan organik tanah, serta lingkungan fisik (pH, kelembapan).

Seleksi isolat bakteri potensial sebagai agens biokontrol, didahului oleh uji keamanan hayati. Supriadi (2006) mengungkapkan bahwa agens hayati tidak hanya menitikberatkan pada keefektifannya saja, namun keamanan bagi kesehatan manusia, hewan, dan lingkungan. Pada pengujian keamanan hayati memperlihatkan sebanyak 9% isolat bakteri berbahaya bagi manusia dan hewan karena berpotensi sebagai patogen mamalia. Proses hemolisis disebabkan oleh enzim yang dilepaskan oleh mikroorganisme yang diterima oleh agar darah merah sehingga terjadi reaksi untuk melisiskan butir darah merah tersebut. Kelompok bakteri yang sering dibedakan berdasarkan kemampuan melisiskan butir darah merah adalah *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. Sementara itu, pada uji hipersensitif, 47,2% isolat bakteri merupakan patogen tanaman yang ditunjukkan dengan adanya gejala nekrosis pada infection site. Menurut Agrios (2005), respon hipersensitif merupakan bentuk pertahanan tanaman inang yang

berkembang secara cepat akibat adanya infeksi patogen. Kematian sel akibat hipersensitif terjadi hanya pada jaringan yang terinfeksi untuk melindungi penyebaran patogen ke jaringan tanaman yang sehat. Isolat bakteri endofit yang menunjukkan reaksi negatif bersifat non patogen dan berpotensi sebagai agens biokontrol.

Karakterisasi isolat bakteri diperoleh jumlah bakteri Gram positif (58,3%) lebih dominan dibandingkan dengan Gram negatif (41,6%). Bakteri Gram negatif mengandung peptidoglikan yang sedikit sekali, berada di antara selaput luar dan selaput dalam dinding sel. Dinding sel bakteri gram negatif sebelah luar merupakan komponen yang terdiri dari fosfolipid dan beberapa protein yang disebut auto layer. Bakteri Gram negatif umumnya resisten terhadap asam maupun logam. Toleransi ini bersifat relatif karena keragaman bakteri yang resisten terhadap pH rendah dipengaruhi oleh jenis bakteri, komposisi asam lemak, dan protein penyusun membran (Susanti et al., 2007). Ahmad et al. (2005) juga menyatakan bahwa bakteri Gram negatif umumnya lebih toleran terhadap pengaruh logam berat dibandingkan bakteri Gram positif karena struktur dinding selnya yang kompleks sehingga dapat mengikat dan mengimobilisasi sebagian besar ion logam berat. Karakter Gram positif dikemukakan oleh Fardiaz (1992), bahwa kelompok bakteri ini memiliki dinding sel yang sebagian besar terdiri dari lapisan peptidoglikan (90%) dan lapisan lainnya adalah asam teikoat dan asam teikuronat. Asam teikoat dalam dinding sel yang bermuatan negatif dapat bereaksi dengan alkohol sehingga menyebabkan dehidrasi pada dinding sel. Asam teikoat terdiri dari gula netral seperti galaktosa, manosa, ramnosa, arabinosa dan glukosamin. Isolat bakteri non patogen baik gram positif maupun gram negatif mempunyai peran penting sebagai agens biokontrol dalam mengendalikan penyakit tanaman.

Dari isolat-isolat bakteri yang diperoleh, belum menunjukkan potensinya sebagai pelarut fosfat dan kitinase. Namun demikian, beberapa isolat mempunyai peran sebagai agens biokontrol terhadap patogen *F. oxysporum* penyebab penyakit layu pada tanaman tomat. Sembilan isolat dapat menekan perkembangan koloni patogen sebesar 20,0–72,5%, dan 3 isolat menghasilkan daya hambat di atas 50%. Dua isolat bakteri endofit mempunyai daya hambat tinggi, yaitu 72,5% dan 60%. Secara umum, penghambatan isolat bakteri terhadap patogen dengan beberapa mekanisme. Junaid et al. (2013) menjelaskan mekanisme antagonis dapat berupa (1) antibiosis, (2) kompetisi, (3) mikoparasitisme, (4) enzim pendegradasi dinding sel, dan (5) penginduksi ketahanan, (6) pemacu pertumbuhan, dan (7) pengoloni rizosfer.

Ketiga isolat bakteri yang mempunyai daya hambat tertinggi menunjukkan reaksi antibiosis, yaitu terdapat antibiotik yang disekresikan bakteri sehingga menyebabkan perubahan warna koloni patogen. Menurut Haggag dan Mohamed (2007), antibiosis merupakan mekanisme antagonis dengan menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik atau senyawa mirip antibiotik seperti enzim pelisis, senyawa yang mudah menguap, siderofor, dan substansi toksik lainnya. Antibiotik didefinisikan sebagai senyawa organik dengan berat molekul rendah, yang dihasilkan sebagai metabolit sekunder dan menghambat pertumbuhan atau aktivitas metabolisme mikroba lain pada konsentrasi rendah. Bakteri sebagai agens biokontrol menghasilkan senyawa bioaktif anti fungi untuk menekan perkembangan patogen. Okafor (2007) menjelaskan senyawa bioaktif yang dihasilkan organisme hidup merupakan metabolit sekunder. Mikroba akan menghasilkan metabolit sekunder setelah memasuki fase pertumbuhan sel, diakhir fase log dan dalam fase stasioner. Mikroba prokariot (bakteri) dapat menghasilkan senyawa antibiotik atau

anticendawan yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri maupun cendawan patogen. Salah satu kelompok senyawa anticendawan adalah ergosterol inhibitor yang bekerja dengan cara merusak fungsi membran sel dan menyebabkan permeabilitas membran sehingga terjadi kematian sel (Madigan et al. 1996).

Keberadaan bakteri endofit pada jaringan tanaman, seperti halnya populasi bakteri rizosfer dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Munif (2012) menyebutkan, spesies bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman bergantung pada genotipe tanaman, umur tanaman, jaringan yang diambil dan juga musim ketika isolasi dilakukan. Pengaruh faktor lingkungan antara lain, sifat tanah, bahan organik dalam tanah, teknik budi daya, pemupukan, dan aplikasi pestisida. Bakteri endofit di dalam satu tanaman inang tidak terbatas pada satu spesies bakteri saja, namun terdiri atas beberapa genus dan spesies. Tanaman memiliki relung yang beragam untuk bakteri endofit. Halman et al. (1997) dalam Munif et al. (2012) menjelaskan bahwa keberadaan bakteri endofit lebih terlindungi dari stres faktor abiotik, menempati relung yang sama dengan patogen tanaman, namun mampu mengkolonisasi jaringan tanaman dan proses translokasi senyawa metabolit ke dalam jaringan tanaman lebih baik.

Potensi bakteri endofit sebagai agens biokontrol dalam menekan perkembangan *F. oxysporum* penyebab penyakit layu fusarium pada tanaman tomat, telah dilaporkan oleh Diarta et al. (2016), bahwa *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. mampu menghambat perkembangan patogen *F. oxysporum* dengan mekanisme antibiosis. Hasil penelitian Angel et al. (2017) melaporkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* yang diisolasi dari tanaman kentang sebagai agens biokontrol yang menekan pertumbuhan *F. oxysporum*, serta sebagai plant growth. Malinda et al. (2018) juga melaporkan 2

isolat bakteri endofit asal tanaman kedelai mampu menekan pertumbuhan *F. oxysporum* in vitro.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, GN. 2005. Plant pathology. Fifth Edition. USA: Elsevier Academic Press.
- Ángel EC, Castillo DH, Fuentes YMO, Morales GG, Reyes FC, Martín F. 2017. Endophytic bacteria controlling *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in *Solanum tuberosum*. European Journal of Physical and Agricultural Sciences 5(1): 29-39.
- Ahmad I, Hayat S, Ahmad A, Inam A, Samiullah. 2005. Effect of heavy metal on survival of certain groups of indigenous soil microbial population. Journal Applied Science Environment, 115–121.
- Bontidean I, Ahlqvist J, Mulchandani A, Chen W, Bae W, Mehra RK, Mortari A, Csöregi E. (2003). Novel synthetic phytochelatin-based capacitive biosensor for heavy metal ion detection. Biosensors Bioelectronics, 18, 547-553.
- Chandra TJ, Mani S. (2011). A study of 2 rapid tests to differentiate Gram positive and Gram negative aerobic bacteria. Journal Medicine Allied Science 1(2): 84–85.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant edition. New Jersey (US): Prentice-Hall, Inc.
- Diarta I Made, Javandira C, Widnyana I Ketut. 2016. Antagonistik bakteri *Pseudomonas* spp. dan *Bacillus* spp. terhadap jamur *Fusarium oxysporum* penyebab penyakit layu tanaman tomat. Jurnal Bakti Saraswati 5(1): 71–75.
- Fokkema NJ. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiological Plant Pathology 3: 195–205.
- Haggag WM, Mohamed HAA. 2007. Biotechnological aspects of microorganism used in plant biological control. World J. Agric. Sci. 3(6): 771–776.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta.
- Jatnika W, Abadi AL, Aini LQ. 2013. Pengaruh aplikasi *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. terhadap perkembangan penyakit bulai yang disebabkan oleh jamur patogen *Peronosclerospora maydis* pada tanaman jagung. Jurnal HPT 1(4): 19–29.
- Junaid JM, Dar NA, Bhat TA, Bhat AH, Bhat MA. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. Int. J. Modern Plant & Anim. Sci. 1(2): 39–57.
- Klement Z, Goodman RN. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Phytopathology 5(1): 17–44.
- Kurniawati S, Mutaqin KH, Giyanto. Eksplorasi dan uji senyawa bioaktif bakteri agensia hayati untuk pengendalian penyakit kresek pada padi. HPT Tropika 15 (2): 170–179.
- Madigan MT, John MM, dan Jack P. 1996. Brock Biology of Microorganisms 8th.
- Malinda SN, Soekarno BPW, Yuliani TS. 2018. Penghambatan *Fusarium oxysporum* oleh kultur filtrat bakteri endofit dari tanaman kedelai secara in vitro. Jurnal Fitopatologi Indonesia 11(6): 196–204. DOI: 10.14692/jfi.11.6.196
- Munif A, Wiyono S, Suwarno. 2012. Isolasi bakteri endofit asal padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan. Jurnal Fitopatologi Indonesi 8(3): 57–64.

- Okafor N. 2007. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. New Pathogens. Minnesota (US): APS Press.
- Pratiwi RS, Susanto TE, Wardani YAK, Sutrisno A. 2015. Enzim kitinase dan aplikasi di bidang industri: Kajian pustaka. Jurnal Pangan dan Agroindustri 3(3): 298–303.
- Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U. 2013. Distinct Phyllosphere Bacterial Communities on Arabidopsis Wax Mutant Leaves. *PLoS ONE* 8(11): e78613. doi:10.1371/journal.pone.0078613.
- Susanti, I, Kusumaningtyas, R, dan Illaningtyas, F. 2007. Uji sifat probiotik bakteri asam laktat sebagai kandidat bahan pangan nasional. Jurnal Teknologi Industri Pangan XVIII, 89–95.
- Vorholt JA. 2012. Microbial Life in the Phyllosphere. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.
- Zimbro MJ, Power DA. 2009. Difco and BBL Manual: Manual of Microbiological Cultur Media. 2nd edition. Maryland (MD): Becton, Dickinson and Company.