

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Endofit

2.1.1 Pengertian Bakteri Endofit

Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*), daun, akar, buah, dan batang (Simarmata *et al.*, 2007). Isyarat diciptakannya bakteri atau makhluk hidup yang lebih kecil dari padanya telah difirmankan oleh Allah SWT. dalam QS. Al-Baqarah (2):26 dibawah ini:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۚ فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ
الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۗ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۗ يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا
وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا ۗ وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴿٢٦﴾

Artinya: *"Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, Maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?." dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik"* (QS. Al-Baqarah:26).

Ibnu Katsir menafsirkan bahwa kata (*yang lebih rendah dari itu*), menunjukkan bahwa Allah SWT kuasa untuk menciptakan apa saja, yaitu penciptaan apapun dengan obyek apa saja, baik yang besar maupun yang lebih kecil. Allah SWT tidak pernah menganggap remeh sesuatu pun yang Dia

ciptakan meskipun hal itu kecil. Orang-orang yang beriman meyakini bahwa dalam perumpamaan penciptaan yang dilakukan oleh Allah memiliki manfaat bagi kehidupan manusia (Al-Mubarak, 2006). Sebagaimana Allah menciptakan bakteri endofit meskipun ukurannya sangat kecil tetapi keberadaannya memiliki manfaat yang besar bagi kehidupan manusia dan tumbuhan.

Beberapa manfaat mikroba endofit antara lain sebagai agen biokontrol tanaman (Harni *et al.*, 2006), anti mikroba, anti kanker (Kumala, 2009), antioksidan, antiinflamasi, immunosupresi, dan antidiabetes (Rahmawati, 2009). Selain itu bakteri endofit juga sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dengan menghasilkan hormon pertumbuhan dan ketersediaan nutrisi tertentu (Supramana, 2007). Syamarlina dan Hanafi (2006) menyatakan bahwa bakteri endofit memiliki potensi menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya bergantung dari potensi yang dimiliki oleh tanaman tersebut.

Menurut Strobel and Daisy (2003) terdapat hampir 300.000 spesies tanaman yang ada di bumi ini, masing-masing tanaman merupakan inang dari satu atau lebih mikroba endofit. Mikroba endofit dapat hidup di dalam jaringan tanaman pada fase tertentu dalam siklus hidupnya, dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (Yingwhu shi *et al*, 2009; Radji, 2005; Syarmalina dan Hanafi, 2006). Secara alami bakteri endofit hanya terdapat pada organ tanaman yang sehat dan umumnya bakteri endofit merupakan kelompok dari

genus bakteri tanah, seperti *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, dan *Azospirillum* (Thagavi *et al*, 2005).

Menurut Hungl and Annapurna (2004) mikroorganisme dikatakan sebagai endofit apabila mikroba tersebut berada dalam jaringan tanaman setidaknya satu bagian dari siklus hidupnya. Bakteri endofit memiliki sifat yang sangat unik dimana fisiologi tumbuhan yang berasal dari spesies yang sama namun tumbuh pada lingkungan yang berbeda, maka bakteri endofit yang dihasilkan akan berbeda pula sesuai dengan kondisi lingkungannya. Keanekaragaman makhluk hidup telah dijelaskan dalam Al-Qur'an surat. Ar-Ra'd (13): 4 sebagai berikut:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُّتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَىٰ
بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضَ لِبَعْضِهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ



Artinya. "Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir (QS. Ar-Ra'd (13): 4).

Ayat di atas menjelaskan bahwa setiap tanaman memiliki kelebihan dari tanaman lain, sebagai contoh tanaman bawang putih yang diambil dari tempat berbeda dengan kondisi cuaca yang berbeda, maka rasa dan aroma yang dihasilkan oleh bawang putih akan berbeda pula. Begitupun bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman yang sama akan tetapi berada di lokasi

yang berbeda maka jenis bakteri endofit yang dihasilkan akan berbeda pula. Hal ini menunjukkan adanya bukti-bukti kekuasaan Allah SWT yang menciptakan alam semesta dengan beraneka ragam jenis dan manfaatnya.

Secara umum fungsi mikroba digolongkan menjadi empat, yaitu (1) meningkatkan ketersediaan unsur hara tanaman dalam tanah, (2) sebagai perombak bahan organik dalam tanah dan mineralisasi unsur organik, (3) bakteri rizosfer-endofitik memacu pertumbuhan tanaman dengan membentuk enzim dan melindungi akar dari mikroba patogenik, (4) sebagai agensia hayati pengendali hama dan penyakit tanaman (Saraswati *et al.*, 2006).

Bakteri endofit merupakan kelompok bakteri yang menguntungkan. Bakteri ini mampu mengendalikan patogen tanaman serta, menginduksi ketahanan tanaman dan meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkannya. Beberapa bakteri endofit diketahui banyak dimanfaatkan dibidang kesehatan sebagai bahan baku obat seperti antibiotic, antikanker, antioksidan, antiinflamasi, imunosupresi, dan antidiabetes (Rahmawati, 2009). Dalam bidang pertanian bakteri endofit dimanfaatkan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman, memfiksasi nitrogen bebas, dan menginduksi penghambatan mikroba patogen pada tanaman (Hungl and Annapurna, 2004).

Banyaknya potensi bakteri endofit yang dapat dimanfaatkan oleh manusia merupakan salah satu anugerah, nikmat dan rahmat Allah SWT. Keberadaan bakteri tersebut merupakan sebagian dari tanda-tanda

kekuasaan Allah, sehingga apa yang telah diciptakan-Nya patut untuk disyukuri dan dipelajari. Al-Quran secara tegas menyebutkan bahwa apa yang ada di langit dan di bumi telah ditundukkan untuk manusia. Sebagaimana firman Allah dalam QS. Al-Jaatsiyah (45): 13 yang berbunyi:

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ
يَتَفَكَّرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya: "Dan Dia Telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) dari pada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir." (QS. Al-Jaatsiyah [45]: 13).

Ayat di atas, menjelaskan bahwa Allah telah menciptakan makhluk hidup yang ada di bumi, termasuk hewan dan tumbuhan. Makhluk hidup tersebut perlu dikaji oleh manusia karena keduanya disamping sangat bermanfaat juga merupakan tanda-tanda dari eksistensi-Nya. Jutaan jenis hewan dan tumbuhan yang ada di jagad raya ini hadir sebagai tanda yang membuktikan keberadaan sang pencipta (Rosyidi, 2008).

2.1.2 Asosiasi Bakteri Endofit dengan Tanaman

Pola hubungan atau asosiasi mikroba endofit dengan akar tanaman sebagai relungnya dapat bersifat mutualisme, komensalisme, saprofit, dan parasit. Bakteri endofit umumnya bersimbiosis mutualisme dengan tanaman inangnya. Bakteri ini memberi manfaat kepada tanaman inang antara lain berupa peningkatan laju pertumbuhan, ketahanan tanaman terhadap

serangan hama, penyakit dan kekeringan. Hubungan yang erat antar keduanya juga memungkinkan adanya transfer materi genetika diantara keduanya (Ilyas, 2006).

Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini dengan berpasang-pasangan. Allah berfirman dalam Al-Qur'an surat Adz-Dzariyaat (51): 49 sebagai berikut:

وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ ﴿٤٩﴾

Artinya. *“Dan segala sesuatu Kami ciptakan berpasang-pasangan supaya kamu mengingat kebesaran Allah”* (QS. Adz Dzariyaat [51]: 49).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi selalu disertai dengan pasangannya. seperti halnya penciptaan seorang laki-laki dengan perempuan, siang dengan malam, hujan dengan panas, begitu pula bakteri endofit yang diciptakan oleh Allah secara berdampingan dengan tanaman inangnya. keduanya berkaitan sangat erat dimana bakteri tidak akan dikatakan sebagai endofit jika tidak berada di dalam tanaman, dan tanaman merupakan inang dari 1 jenis mikroba endofit atau lebih. Interaksi keduanya saling berkaitan satu sama lain dalam hal nutrisi dan pertahanan.

Salah satu bentuk interaksi atau simbiosis bakteri endofit dengan tanaman inangnya adalah mutualisme. dalam hal ini bakteri endofitik mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang patogen sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang

diperlukan selama hidupnya (Tanaka *et al.*, 1999). Mikroba endofit dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (Syarmalina dan Hanafi, 2006).

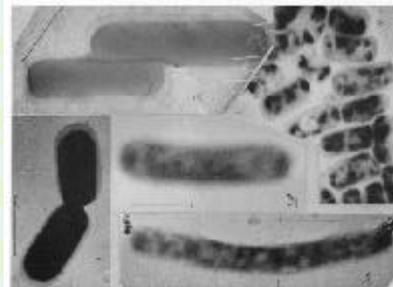
Menurut Djatmika (2007) bakteri endofit efektif mengendalikan beberapa patogen karena mempunyai kemampuan hidup pada permukaan dan masuk jaringan daun sesudah jaringan inang, serta mendegradasi komponen dinding sel dengan enzim hidrolitik (selulase, pektinase, dan xilanase).

Sebenarnya bakteri endofit maupun rizobakteri lainnya merupakan bagian dari mikroflora alamiah dari tanaman yang sehat di lapangan, mereka dapat dikatakan sebagai kontributor penting bagi kesehatan tanaman. Telah diketahui pula bahwa bakteri endofit dapat berpengaruh pada kesehatan tanaman dalam hal: (1) antagonisme langsung atau penguasaan relung atas patogen, (2) menginduksi ketahanan sistemik dan (3) meningkatkan toleransi tanaman terhadap tekanan lingkungan. Karena sifat-sifat tersebut bakteri endofit telah terbukti dapat dimanfaatkan sebagai pengendali hayati penyakit tanaman bahkan dapat mengurangi serangan hama tanaman (Saraswati dan Sumarno., 2008).

2.2. Karakteristik Bakteri Endofit Dari Tanaman Kentang

2.2.1 *Bacillus mycoides*

Bacillus mycoides merupakan bakteri dari genus *Bacillus* Gram positif, sel membentuk rantai 5-6 sel, non-motil, anaerob fakultatif, suhu untuk pertumbuhannya sekitar 15-40°C, bisa membentuk asam dari glukosa, dan biasanya berukuran lebih dari 3 µm (Knaysi, *et al.*, 1947). Adapun bentuk bakteri *Bacillus mycoides* dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 2.1. Bentuk bakteri *Bacillus mycoides* (Knaysi *et al.*, 1947).

memiliki endospora, pada kondisi lingkungan yang ekstrem bakteri menghasilkan endospora yang bisa dorman selama periode yang panjang. Habitat bakteri ini dapat ditemukan di debu, tanah yang subur, tanaman-tanaman, binatang-binatang, susu, air dan bakteri ini berbentuk batang. *Bacillus* secara khusus dapat memproduksi enzim protease ekstraseluler (Fincan and Okumus, 2007).

B. mycoides jika ditumbuhkan pada media padat akan membentuk koloni yang bersulam / beranyaman, bakteri ini menyebabkan infeksi saluran pernapasan (Anonymous, 2010). *B. mycoides*, merupakan bakteri non

patogenic pada tanaman, bakteri ini menghuni bagian filosfer, mampu mereduksi bintik daun *Cercospora* (*Cercospora beticola* Sacc.) dari bit gula dengan presentase 38-91% baik pada percobaan rumah kaca maupun pada ladang. Mampu mengendalikan penyakit dengan cara menginduksi ketahanan sistemik tanaman. Melalui beberapa pengujian menunjukkan bahwa *B. mycooides* mampu memproduksi enzim kitinase, β 1,3-glukanase, dan peroksidase, semua protein yang berhubungan dengan patogenesis dan diterima sebagai indikator dari ketahanan sistemik (Bargabus *et al.*, 2002).

2.2.2 *Pseudomonas pseudomallei*

Bakteri genus *Pseudomonas* umumnya berbentuk batang lurus atau sedikit berombak, tapi tidak berbentuk heliks, bakteri ini berukuran 0,5-1,0 x 1,5-5,0 μ m. banyak spesies menghimpun β -hydroxybutyrate sebagai bahan cadangan karbon. Mereka tidak memproduksi fosfat dan tidak dikelilingi oleh lapisan-lapisan. Tidak memiliki fase istirahat yang diketahui, termasuk strain sel gram negatif Pergerakan terjadi karena adanya satu atau beberapa flagel yang polar (Kunkel, 2010).

Kebanyakan spesies dari genus *Pseudomonas* tidak dapat tumbuh dalam kondisi asam (pH 4,5). Sebagian besar spesies tidak membutuhkan bahan organik sebagai faktor tumbuh. Oksidasi positif atau negatif. Katalase positif dan kemoorganotrofik beberapa spesies merupakan kemolitotrof yang bisa menggunakan H₂ atau CO sebagai sumber energi.



Gambar 2.2. Bentuk bakteri *Pseudomonas pseudomallei* (Kunkel, 2010)

Pseudomonas pseudomallei merupakan bakteri batang gram negatif yang tidak meragi karbohidrat, bersifat aerob. *Pseudomonas pseudomallei* kini dinamakan *Burkholderia pseudomallei*, bakteri ini dapat menyebabkan melioidosis (Mayasari, 2005). Habitat *Pseudomonas pseudomallei* ini tersebar luas di alam dan memegang peranan penting dalam pembusukan zat organik (Chowdhury And Heinemann, 2006.).

2.2.3 *Klebseilla ozaenae*

Berbentuk batang lurus, berdiameter 0,3 - 1 μm dan panjangnya 0,6-6 μm , tersusun secara tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek, Sel diselubungi oleh kapsul. Merupakan gram negatif, tidak bergerak, anaerobic fakultatif, kemoorganotrofik, memiliki 2 tipe metabolisme yaitu respirasi dan fermentatif. suhu optimal adalah 37°C. Mampu mengkatalis D-glukosa dan karbohidrat lain dan menghasilkan asam dan gas, tapi strain terjadi secara anaeroganik. Oksidasi *negatif* dan katalase positif. Beberapa spesies mampu menghidrolisis urea. tumbuh pada KCN. Tidak memproduksi H₂S dan mereduksi nitrat. *Klebsiella ozaenae* termasuk jenis bakteri yang koloninya

berbentuk lendir/mukoid, bakteri ini dapat menyebabkan penyakit *athopic rhinitis*.

2.3 Enzim-enzim Yang Dihasilkan Bakteri Endofit Dalam Menginduksi Ketahanan Tanaman

2.3.1 Enzim Kitinase

Enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri endofit, *B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae* memiliki peranan penting sebagai agen pengendali hayati patogen tanaman secara mikroparasitisme (Nugroho *et al.*, 2003), karena pada umumnya patogen tanaman tersusun atas kitin. Kitin merupakan penyusun lapisan terluar nematoda, dinding sel jamur dan eksoskeleton serangga (Campbell *et al.*, 2002), sehingga enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri endofit ini mampu mendegradasi lapisan terluar patogen yang tersusun atas kitin.

Kitin merupakan biopolimer terbanyak kedua di alam setelah selulosa dan memiliki kombinasi sifat-sifat khas seperti bioaktivitas, biodegradabilitas dan sifat liat, sehingga merupakan jenis polimer yang menarik dan dapat dimanfaatkan di berbagai bidang. Kitin merupakan senyawa golongan karbohidrat yang dapat dihasilkan dari limbah laut, khususnya dari golongan udang, kepiting, ketam dan kerang (Yurnaliza, 2002).

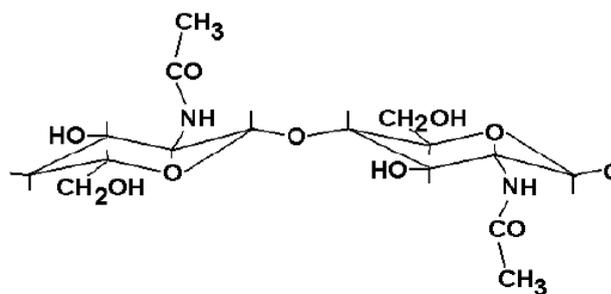
Allah menundukkan banyak jenis binatang dengan beragam bentuk dan keistimewaan agar dapat dimanfaatkan oleh manusia. Allah berfirman dalam QS. Ibrahim (14): 34 sebagai berikut:

وَأَتَّكُم مِّن كُلِّ مَا سَأَلْتُمُوهُ وَإِن تَعُدُّوا نِعْمَتَ اللَّهِ لَا تَحْصُوهَا ... ﴿٣٤﴾

Artinya. “Dan Dia telah memberikan kepadamu (keperluanmu) dan segala apa yang kamu mohonkan kepadanya. dan jika kamu menghitung nikmat Allah, tidaklah dapat kamu menghinggakannya. (QS. Ibrahim [14]: 34).

Maksud yang terkandung dalam ayat tersebut yaitu bahwa Allah telah menyediakan segala sesuatu yang ada di alam termasuk hewan dengan beragam bentuk, ukuran dan fungsi untuk mencukupi kebutuhan manusia. Ada yang memanfaatkan dagingnya untuk dimakan, tenaganya untuk tunggangan, kulitnya untuk hiasan, dan memanfaatkan limbahnya untuk kepentingan lain, seperti limbah udang dan kepiting yang dimanfaatkan sebagai sumber kitin.

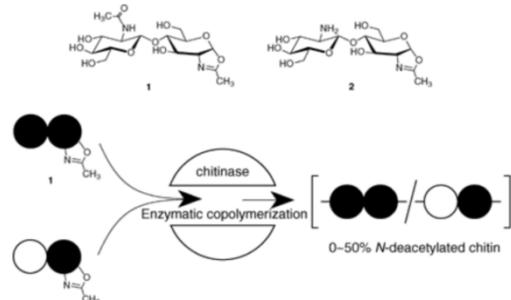
Kitin merupakan glukosamin polisakarida yang mengandung nitrogen sebanyak 7% dan secara struktur mirip dengan selulosa. Rumus molekul kitin dapat ditulis $(C_8H_{13}NO_5)_{11}$. Yang membedakan antara kitin dan selulosa adalah pada ikatan C-2 yakni OH diganti dengan $NHCOCH_3$ sebagai pengganti gugus hidroksil. Satu unit struktur kitin ditunjukkan pada gambar 2.5 dibawah ini:



Gambar 2.3. Struktur Kitin (Yurnaliza, 2002)

Kitin berbentuk padat, tidak berwarna, tidak larut dalam air, asam encer, alkohol dan semua pelarut organik lainnya, tetapi kitin dapat larut dalam fluoroalkohol dan asam mineral pekat (Richards, 1951 dalam Yurnaliza, 2002). Koloidal kitin adalah kitin yang banyak digunakan sebagai substrat dalam medium fermentasi. Senyawa ini diperoleh dengan menghidrolisis secara parsial kitin dengan larutan asam klorida (HCl) 10 N (Haran *et al.*, 1995 dalam Yurnaliza, 2002).

Kitin dapat dihidrolisis oleh enzim kitinase. Enzim kitinase merupakan enzim yang berperan dalam pengendalian hayati jamur, nematoda dan serangga secara mikroparasit. Enzim kitinase ini mampu menguraikan kitin pada dinding sel jamur, nematoda dan eksoskeleton serangga menjadi N-asetil glukosaminida. Faktor yang menginduksi sintesis kitinase adalah kemampuan sel mikroorganisme untuk mengenal struktur fisik kitin seperti susunan rantai, contoh mekanisme sintesis kitinase pada *Streptomyces olivaceoviridis*. Mikroorganisme ini memproduksi protein seperti lektin (*lectin-like protein*) yang mengikat secara khusus pada kristal α -kitin. Sel juga dapat mengenal derajat deasetilasi dari jumlah glukosamin dan GlcNAc relatif yang dibebaskan selama degradasi kitin (Dewi, 2008).



Gambar 2.4. Proses pemecahan kitin menjad N-asetil glukosaminida (Makino *et al.*, 2006)

Bakteri endofit dapat menginduksi ketahanan tanaman dengan cara menghasilkan enzim kitinase (Yurnaliza, 2002). Bakteri kitinolitik memanfaatkan kitinase untuk asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Enzim kitinase ini digunakan sebagai pertahanan melawan serangan organisme patogen (Guswenrivo, 2008).

Enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri endofit (*B. mycoides*, *P. Pseudomallei*, dan *K. ozaenae*) dimanfaatkan secara langsung untuk melakukan penetrasi kutikula sista *G. rostochiensis* dan menghidrolisis telur nematoda *G. rostochiensis* yang sebagian besar penyusunnya adalah zat kitin (Wardhani, 2009). Penetrasi kutikula oleh *Bacillus* dilakukan dengan memulai pertumbuhan spora pada kutikula. Spora bakteri menempel pada tubuh nematoda kemudian berkecambah dan menembus kutikula nematoda (Mustika, 2006). Kemudian enzim kitinase akan menghidrolisis kulit telur nematoda yang sebagian besar penyusunnya adalah kitin (Indarti, 2008). Selanjutnya perkembangbiakan nematoda menjadi terhambat dan akhirnya akan mati (Mustika dan Nuryani, 2006).

Nasahi (2010), menyatakan bahwa mekanisme antagonis bakteri endofit untuk mengendalikan patogen tanaman dapat dikelompokkan menjadi 3, yaitu;

1. Terjadinya kompetisi bahan makanan antara mikroorganisme yang berada di dalam tanah. Adanya pertumbuhan mikroorganisme yang begitu cepat akan mendesak pertumbuhan mikroba patogen.

2. Mikoparasitisme, bakteri endofit merupakan bakteri yang bersifat mikoparasit, artinya bakteri ini dapat menghambat pertumbuhan patogen dengan parasitisme. Misalnya jamur *Trichoderma*, yang dapat melilit hifa jamur patogen, selain itu jamur ini juga mengeluarkan enzim yang dapat mendegradasi dinding sel jamur patogen, sehingga jamur patogen mati. Beberapa jenis enzim pelisis yang telah diketahui dihasilkan adalah enzim kitinase dan β -1,3-glucanase
3. Antibiosis, bakteri endofit juga mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Ketiga mekanisme ini berjalan secara simultan.

Pengendalian hayati jamur dengan menggunakan mikroorganisme kitinolitik didasarkan pada kemampuan mikroorganisme menghasilkan kitinase dan β -1,3-glucanase yang dapat melisiskan sel jamur. Kemampuan kitinolitik genus *Bacillus* telah banyak digunakan untuk mengendalikan beberapa jamur patogen tanaman. Beberapa bakteri kitinolitik juga telah digunakan untuk pengendalian nyamuk *Aedes aegypti* (Pujiyanto *et al.*, 2008). Hallmann *et al.* (1997) dalam Harni (2007) melaporkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari mentimun dan kapas seperti *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. vasicularis*, *Serratia marcescens*, dan *Spingomonas pancimobilis* dapat mengurangi populasi *M. incognita* pada mentimun sampai 50%. Aplikasi bakteri endofit melalui perlakuan benih dapat mengurangi 30-50% jumlah puru (*gall*) *M.*

incognita pada tanaman kapas dan *P. chlororaphis* galur Sm3 pada stroberi dapat mengurangi populasi nematoda peluka akar *Pratylenchus penetrans* sebesar 41-61% serta mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman (Hackenberg *et al.*, 2000 dalam Harni, 2007).

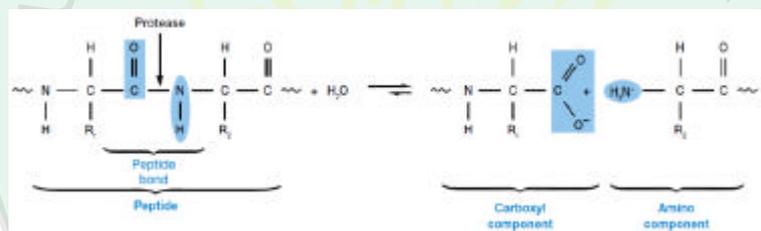
Sebagian besar mikroba pendegradasi kitin adalah mikroorganisme tanah dan air (Singh *et al.*, 1999). Menurut Pujiyanto *et al.* (2008) beberapa bakteri tanah dari genus *Streptomyces*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Klebsiella* (Wang *et al.*, 1997), *Alteromonas*, *Chromobacterium* *Arthrobacter*, dan *Vibrio* (Singh *et al.*, 1999; 92), dan beberapa spesies bakteri antara lain *Aeromonas sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Clostridium sp.*, *Enterobacter liquefaciens*, *Flavobacterium indoltheticium*, *Klebsiella sp.*, *Micrococcus colpogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia marcencens*, *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *Bacillus* dan *Pyroccus* (Gao *et al.*, 2010), dilaporkan memiliki aktivitas kitinolitik, yakni mampu menguraikan kitin. Kemampuan ini menyebabkan kelompok bakteri tersebut berpotensi besar dimanfaatkan sebagai pengendali hayati beberapa jenis fungi patogen, nematoda dan hama tanaman.

2.3.2 Enzim protease

Protease atau enzim proteolitik adalah enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein. Protease merupakan enzim yang sangat penting

untuk industri dan pertanian, pemanfaatannya mencapai 65% dari total enzim yang ada (Ummulbalqis, 2006).

Enzim protease akhir-akhir ini mendapat perhatian besar, karena enzim ini berperan penting dalam pengendalian hayati. Enzim protease bersamaan dengan kitinase mampu mendegradasi komponen kutikula serangga, jamur patogen, sista nematoda yang tersusun atas protein dan kitin (Nasahi, 2010). Enzim protease bekerja dalam menghambat penetasan telur nematoda (Harni *et al.*, 2010). Enzim protease ini mampu menguraikan protein menjadi peptida-peptida sederhana dan asam amino dengan reaksi proteolisis dibawah ini:



Gambar 2.5. Reaksi Enzim Protease (Prescott, 2002)

Enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit ini berperan penting dalam pengendalian hayati jamur, nematoda, dan serangga. karena ketiganya memiliki lapisan terluar berupa kutikula (*cuticle*). Kutikula merupakan suatu lapisan yang tersusun atas protein dan kitin. Kutikula merupakan pelindung yang tebal dan keras diatas beberapa bagian tubuh hewan, dan setipis kertas dan fleksibel pada bagian tertentu (Campbel, 2003).

Enzim protease ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri endofit berperan penting pada proses penetrasi dan migrasi jaringan inang.

Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikrobal dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain penghambatan terhadap sintesis penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim dan destruksi atau penghambatan terhadap sintesis protein (misalnya, penghambatan translasi dan transkripsi material genetik) dan penghambatan terhadap sintesis asam nukleat. Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma yang berperan sebagai barrir permeabilitas selektif, membawa fungsi transpor aktif, dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi integritas membran sitoplasma dirusak maka makromolekul dan ion keluar dari sel, kemudian sel akan rusak (Brooks *et al.*, 2005 dalam Ummulbalqis, 2006).

Enzim protease ekstraseluler yang dihasilkan oleh Bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) berfungsi untuk mendegradatif dinding sel jamur secara intraseluler. Dinding *Fusarium sp* tersusun atas 39% kitin, 29% glukukan, 7% protein, dan 6% lemak (Juanda, 2009). Kebanyakan ECM (*Extracellular Material*) hifa jamur terdiri dari protein dan karbohidrat (Nicholson 1996 dalam Lopez-Llorca *et al.*, 2006). Kulit telur nematoda yang paling utama juga terdiri dari protein dan chitin (Bird dan Bird, 1991 dalam Thikonov *et al.*, 2002) maka dari itu enzim protease dan kitinase ini berpengaruh penting pada penetrasi hifa jamur dan kulit telur nematoda (Thikonov *et al.*, 2002) serta pendegradasi dinding sel jamur patogen yang mengandung kitin dan protein (Suryanto, 2005).

Sebagai contoh mekanisme *Pochonia spp.* menghambat penetasan telur nematoda melalui pelekatan pada kulit telur nematoda dengan cara membentuk *appressorium* pada ujung hifa. Bahan ekstraselular (ECM) mungkin dapat berfungsi sebagai perekat, tetapi mungkin juga terjadi lubang pada kulit telur yang disebabkan oleh adanya penetrasi hifa di bawah *appressorium* jamur. material ekstraselular ini dapat ditandai dengan adanya lektin *Concanavalin A* yang menunjukkan bahwa ECM mengandung gugus mannose atau glukosa yang mungkin terdapat pada rantai glikoprotein (Lopez-Llorca *et al.*, 2006;194). Setelah terjadi penetrasi pada kulit telur, jamur mencerna isi telur, berproliferasi dan kemudian tumbuh di luar telur untuk menembus telur tetangga dalam sista nematoda atau massa telur; sebagai alternatif ia bisa tumbuh sebagai *saprophyt*. (Schulz, 2006).

Mekanisme penghambatan nematoda oleh enzim protease yang dihasilkan bakteri endofit ini merupakan sebuah fenomena alam yang menunjukkan tanda-tanda kebesaran Allah swt bagi manusia yang mau berfikir. Dalam Al-quran surat Al-Ra'd (13): 33 dijelaskan:

وَهُوَ الَّذِي مَدَّ الْأَرْضَ وَجَعَلَ فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْهَارًا وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ جَعَلَ فِيهَا زَوْجَيْنِ اثْنَيْنِ
يُغْشَى اللَّيْلَ النَّهَارَ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿٣٣﴾

Artinya. “ Dan Dia-lah Tuhan yang membentangkan bumi dan menjadikan gunung-gunung dan sungai-sungai padanya. dan menjadikan padanya semua buah-buahan berpasang-pasangan[765], Allah menutupkan malam kepada siang. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan “ (QS. Ar-Ra'd [13]: 33).

Tanda-tanda kebesaran Allah juga dijelaskan dalam surat Al-Hijr (15):

19-21 sebagai berikut

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ ﴿١٩﴾ وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾ وَإِنْ مِنْ شَيْءٍ إِلَّا عِنْدَنَا خَزَائِنُهُ وَمَا نُنزِّلُهُ إِلَّا بِقَدَرٍ مَعْلُومٍ ﴿٢١﴾

Artinya. “Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran. dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezki kepadanya. dan tidak ada sesuatupun melainkan pada sisi Kami-lah khazanahnya[795]; dan Kami tidak menurunkannya melainkan dengan ukuran yang tertentu” (QS. Al-Hijr [15]: 19-21).

Kedua ayat tersebut menjelaskan bahwa makhluk hidup yang ada di bumi hewan dan tumbuhan hadir sebagai ayat yang membuktikan keberadaan sang pencipta. Berpikir mengenai fenomena alam berarti memahami alam dengan segala isinya beserta peristiwa-peristiwa dan proses yang terjadi didalamnya. Termasuk fenomena bakteri endofit dalam menghasilkan enzim protease yang berperan dalam menghambat penetesan telur nematoda. Sehingga tanaman dapat terbebas dari patogen/ penyakit (Rosyidi, 2006).

Adapun fungsi protease adalah untuk mendegradasi komponen matrik ekstraseluler sehingga dapat merusak struktur jaringan inang. Enzim hidrolitik ini digunakan oleh bakteri untuk memperoleh sumber karbon dan energi dengan menghancurkan polimer inang menjadi peptide-peptida sederhana dan asam amino (Salyers dan Whitt 1994 dalam Baihaqi *et al.*,

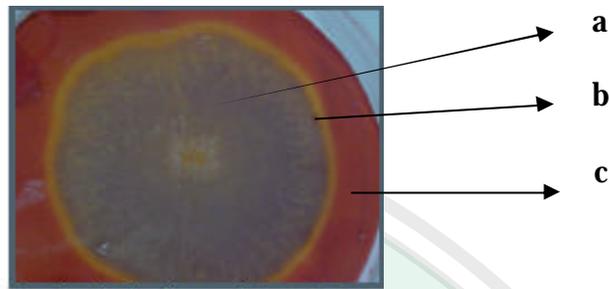
2005). Ada beberapa mekanisme yang terlibat dalam aktifitas biokontrol antara lain kompetisi terhadap nutrisi, produksi *anti-fungal metabolites* (AFMs) dan induksi ketahanan sistemik (ISR/ *Inducer Systemic Resistan*) (Nasahi, 2010).

2.3.3 Enzim Selulase

Salah satu enzim yang digunakan untuk mendegradasi polimer karbohidrat adalah enzim selulase. (Maranata, 2002). Enzim hidrolitik selulase yang dihasilkan oleh *B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* berperan penting dalam mekanisme penetrasi bakteri endofit masuk, menyebar dan menetap di jaringan tanaman inang. Sehingga dengan adanya Enzim selulase yang di sekresikan oleh bakteri endofit membuat bakteri menjadi lebih mudah untuk masuk ke dalam jaringan tanaman (Pham *et al.*, 2010).

Sebagaimana enzim kitinase dan protease yang dihasilkan bakteri endofit, enzim selulase juga dapat digunakan sebagai agen biokontrol tanaman, karena enzim ini dapat menekan aktivitas patogen tanaman secara langsung dan memiliki kemampuan mendegradasi dinding sel fungi dan oomycetes (Gao *et al.*, 2010). Penekanan patogen tanaman oleh bakteri endofit ini dilakukan secara parasitisme atau hiperparasitisme dengan cara menghasilkan enzim selulase yang dapat mendegradasi dinding sel atau struktur yang resisten terhadap jamur phitopatogenic dengan cara penetrasi dan mengabsorpsi seluruh isi sel (Calfoun, 2010). Adapun aktivitas enzim

selulolitik secara kualitatif yang dihasilkan oleh fungi *Chatomium sp* dapat dilihat pada gambar 2.8 dibawah ini:



Gambar 2.6. Aktivitas selulolitik fungi *Chatomium sp* . a. Koloni *Chatomium sp*. b. Zona hidrolitik enzim selulase, c. media CMC-agar (Saraswati *et al.*,2006)

Mekanisme enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri endofit dalam menginduksi ketahanan tanaman diawali dengan proses kolonisasi permukaan tanaman (Gao *et al.*, 2010), pada proses ini bakteri endofit mensekresikan enzim selulase untuk menghidrolisis dinding sel tanaman yang tersusun atas selulose (Gao *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2005). Komponen utama penyusun dinding sel jamur patogen *P. infestans* adalah Selulosa (Purwantisari dan Hastuti, 2009). Dengan adanya enzim selulase, selulosa diubah menjadi gula sederhana (Purwantisari dan Hastuti, 2009) yang secara langsung dapat dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber makanan (Pham *et al.*, 2007). Rusaknya dinding sel tanaman oleh enzim selulase menyebabkan terjadinya luka pada tanaman (Yudiarti, 2007) sehingga memudahkan bakteri tersebut untuk melakukan penetrasi untuk masuk ke jaringan inang (Pham *et al.*, 2007). Kemudian bakteri mengkolonisasi jaringan tanaman dengan melakukan perluasan jaringan invasi pada tanaman inang. Berhasilnya proses ini tergantung pada interaksi

tanaman inang, patogen dan lingkungan (Yudiarti, 2007). Kolonisasi interseluler ini mampu meningkatkan resistensi tanaman terhadap patogen, karena bakteri endofit mampu mengekskresikan senyawa-senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan patogen, sehingga bakteri endofit ini dapat menginduksi ketahanan tanaman.

Enzim selulase dimanfaatkan oleh bakteri endofit untuk menghidrolisis selulosa menjadi selobiosa atau gula sederhana sehingga dapat dimanfaatkan langsung oleh bakteri sebagai sumber makanan. Kemampuan dalam menghasilkan enzim selulase ini membuat bakteri endofit ini berkompetisi dengan mikroba lain dalam memperoleh mineral dan nutrisi makanan (Pham *et al.*, 2010).

Kompetisi adalah mekanisme sebenarnya yang mengkoordinasi seluruh mekanisme biokontrol, agar mikroorganisme dapat mengontrol mikroba lainnya sangat dibutuhkan kemampuan bertahan hidup pada habitatnya, dan sering kali kompetisi ini menyebabkan terjadinya keseimbangan diantara populasi patogen. Fenomena biological control melalui kompetisi melibatkan sebagian besar perebutan ruang dan nutrisi makanan. Kecepatan pertumbuhan maupun efisiensi dalam penyerapan carbon, nitrogen dan nutrisi mineral lainnya, menentukan kemampuan mikroorganisme *survive* pada lingkungannya, maupun adanya suksesi pada populasi (Campbell *et al.*, 1994; Paulitz, 1997 dalam Calfoun, 2010).

2.3. Enzim

Satu ciri khas makhluk hidup adalah terdapatnya proses metabolisme yang diperantarai oleh suatu protein yang disebut enzim (Iswari, 2006). Enzim merupakan senyawa kimia yang dihasilkan sel dan berfungsi sebagai biokatalisator (enzim dapat mempercepat reaksi kimia namun tidak ikut bereaksi). Enzim mengatur kecepatan ribuan reaksi kimia yang berlangsung di dalam sel. Enzim dapat mempercepat suatu reaksi termodinamika sedemikian rupa sehingga kecepatan reaksi dapat berjalan sesuai dengan proses biokimia yang dibutuhkan untuk mengatur kehidupan (Girindra, 1993). Walaupun enzim disintesis di dalam sel, tetapi untuk bertindak sebagai biokatalisator tidak harus berada di dalam sel. (Deswita, 2009).

Menurut Iswari (2006) diperkirakan terdapat 3000 macam enzim di dalam sel. Tanpa adanya enzim maka reaksi selular berlangsung sangat lambat bahkan mungkin tidak terjadi reaksi. Dalam mengkatalis suatu reaksi enzim bersifat sangat spesifik, sehingga meskipun jumlah enzim ribuan di dalam sel dan substratnyaapun sangat banyak, tidak akan terjadi kekeliruan. Substrat adalah substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim. Sedangkan produk adalah substansi baru yang terbentuk setelah reaksi mencapai keseimbangan.

Keseimbangan yang terjadi antara enzim dengan substrat menunjukkan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu di alam ini dengan keadaan yang seimbang. Konsep keseimbangan yang terjadi di alam telah difirmankan Allah dalam Al-Qur'an surat Al-Mulk (67): 3 sebagai berikut:

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا ۗ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ ۗ فَأَرِجِ الْعَبَصَرَ ۗ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ ﴿٣﴾

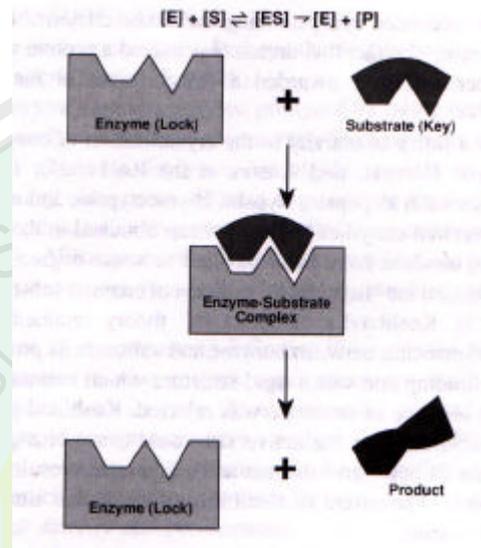
Artinya. “ Yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang, Adakah kamu Lihat sesuatu yang tidak seimbang? (QS. Al-Mulk [67]: 3).

Maksud dari ayat tersebut yaitu segala sesuatu yang diciptakan Allah di alam semesta ini pasti dengan keadaan seimbang. sebagai contoh keseimbangan dalam tingkat sel yaitu osmosis pada membran sel dimana jumlah ion K^+ dan Na^{2+} yang keluar sama dengan jumlah ion yang masuk ke dalam sel hal ini bertujuan agar sel mencapai kondisi yang isotonis (seimbang). Demikian pula keseimbangan antara enzim dengan substratnya, dimana laju reaksi enzim ditentukan oleh jumlah substrat. Semakin banyak substrat yang tersedia maka semakin banyak pula substrat yang menempati sisi aktif enzim. Apabila enzim berada dalam kondisi tidak seimbang dengan substratnya maka enzim akan mengalami kejenuhan.

Enzim dikatakan sebagai suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam proses aktivitas biologis, enzim berfungsi sebagai katalisator dalam sel dan sifatnya sangat khas. artinya suatu enzim hanya mampu menjadi katalisator untuk reaksi tertentu saja. Ada yang bisa mengkatalis suatu kelompok substrat, ada pula yang hanya satu substrat saja, tetapi ada pula yang bersifat stereospesifik (Girindra, 1993).

Enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino-asam amino, rantai polipeptida membentuk globular. Pada globular terdapat celah tempat substrat

yang dikatalis bisa masuk dan bersifat komplementer. Substrat harus benar-benar cocok dengan celahnya (Martoharsono, 2006), seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.7 dibawah ini:



Gambar 2.7. Kerja enzim dalam Memecah Substratnya (Pugh and Chalfont, 1993).

Reaksi yang terjadi antara enzim dan substrat akan membentuk kompleks enzim substrat, yang selanjutnya akan berpisah menjadi enzim dan produk. Hidrolisis merupakan jenis reaksi katalis enzim. Enzim biasa dibedakan atas 2 klasifikasi yaitu enzim endogenus dan eksogenus, berkaitan dengan cara enzim menyerang molekul substrat. Enzim endogenus menyerang substrat pada ikatan interior sedangkan enzim eksogenus mendekati substrat dari satu atau ujung luar yang lain.

Menurut Deswita (2009) semua proses metabolisme merupakan reaksi enzimatik karena melibatkan peran enzim di dalamnya. Dasar kerja enzim yang utama adalah untuk menurunkan energi aktivasi, mempercepat laju

reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan keseimbangan dan mengendalikan reaksi (Martoharsono, 2006).

Energi aktivasi adalah energi yang dibutuhkan suatu zat A yang akan berubah menjadi zat B jika sekurang-kurangnya sebagian dari zat A mendapatkan cukup energi sehingga dapat berada dalam keadaan aktif atau dalam keadaan transisi, yang kemudian bisa berubah menjadi zat B. Enzim akan menurunkan energi aktivasi suatu reaksi jika energi untuk reaksi itu rendah, lebih banyak molekul A (substrat) dapat bereaksi dari pada tanpa enzim (Sasmitamihardja, 1990).

Rata-rata molekul enzim akan beraksi dengan 300 hingga 400 molekul substrat setiap detik terdapat beribu enzim di dunia hayati. Kegunaan sekian banyak enzim adalah dua kali lipat yaitu untuk merombak dan mengoksidasi bahan makanan untuk menyediakan energi dan menggunakan energi ini bagi sintesis bahan baru bagi sel (Volk dan Wheeler, 1988).

2.4.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

a) pH

Enzim tersusun atas asam-asam amino, oleh karena itu pengaruh pH berhubungan erat dengan sifat asam-basa yang dimiliki oleh protein. Pada umumnya enzim menunjukkan titik optimal aktivitas pada pH tertentu (Martoharsono, 2006).

Menurut Iswari (2006) bila pH rendah atau kadar H^+ meningkat, maka gugus yang bermuatan *negatif* menjadi terprotonisasi, karena itu muatan

negatif harus dinetralkan. Bila pH meningkat atau kadar OH^- meningkat, maka gugus yang bermuatan positif di asosiasi, sehingga dinetralkan.

b) Suhu

Reaksi kimia sangat dipengaruhi oleh suhu, reaksi yang dikatalis oleh enzim juga peka terhadap suhu. Enzim sebagai protein akan mengalami denaturasi jika suhu dinaikkan. akibatnya daya kerja enzim menurun. Sampai pada suhu 45°C efek predominannya masih memperlihatkan kenaikan aktivitasnya sebagaimana dugaan dalam teori kinetik, tetapi lebih dari 45°C efek yang berlawanan yaitu denaturasi termal lebih menonjol dan menjelang suhu 55°C fungsi katalitik enzim menjadi punah (Girindra, 1993).

c) Inhibitor Enzim

Senyawa kimia tertentu secara selektif menghambat kerja spesifik enzim, jika inhibitor enzim berikatan secara kovalen, inhibisi yang terjadi umumnya bersifat *irreversible*, akan tetapi akan menjadi baik atau *reversible* jika inhibitor tersebut berikatan melalui ikatan lemah (Campbel, 2002).

Masih menurut Campbel (2002) Terdapat 2 macam inhibitor enzim yaitu

- 1). inhibitor kompetitif terjadi apabila inhibitor menyerupai bentuk substrat yang Normal dan bersaing untuk dapat menempati sisi aktif enzim, inhibisi ini bersifat *reversible* dan dapat mengurangi produktivitas enzim, sehingga untuk mengatasinya konsentrasi substrat harus ditingkatkan agar mampu bersaing dengan inhibitor tersebut.
- 2). inhibitor non kompetitif yaitu inhibitor yang menghambat reaksi enzimatik dengan cara mengikat bagian

lain enzim. Hal ini mengakibatkan terjadinya perubahan molekul enzim sehingga tidak reseptif lagi terhadap substratnya.

d) Kadar Substrat

Laju aktivitas enzim akan meningkat dengan meningkatkan kadar substrat sampai suatu titik. Menyebabkan enzim jenuh terhadap substratnya, penambahan kadar substrat tidak akan berpengaruh pada kecepatan reaksi. Makin rendah kadar substrat yang akan menghasilkan aktivitas maksimum (yaitu menjenuhkan enzim), makin besar hubungan yang dimiliki enzim dengan substratnya (Volk dan wheeler, 1988).