

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksplorasi yang dianalisis deskriptif kualitatif. Penelitian ini menggunakan perlakuan bakteri endofit tunggal (*P. pseudomallei*, *B. mycooides* dan *K. ozaenae*) dan bakteri endofit kombinasi (*P. pseudomallei* dengan *B. mycooides*; *P. pseudomallei* dengan *K. ozaenae*; *B. mycooides* dengan *K. ozaenae*; dan kombinasi *P. pseudomallei*, *B. mycooides* dengan *K. ozaenae*).

3.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 14 Juni – 14 Oktober 2010, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain beaker glass, tabung reaksi, cawan petri, Erlenmeyer, gelas ukur, neraca analitik, *hot plate*, pengaduk magnetik, autoklaf, inkubator, bunsen spiritus, LAF (*Laminar Air Flow*), penggaris, jarum ose, tusuk gigi, aluminium foil, thermometer suhu, sentrifus, pH meter, kertas indikator pH, dan *plastic wrap*.

3.3.2 Bahan

Bakteri endofit yang digunakan adalah *B. mycooides*, *K. ozaenae*, *P. Pseudomallei* koleksi laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi UIN Malang, TSA (*Tryptic Soyc Agar*) untuk peremajaan dan perbanyakkan bakteri endofit, media kitin agar untuk menguji enzim kitinase, media SMA (*Skim Milk Agar*) untuk menguji enzim protease, dan media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) agar untuk menguji enzim selulase secara kualitatif, aquades, HCl 10 N, NaOH 10 N, Congo red 0,1%, dan NaCl 1 M.

3.4 Kegiatan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat dan bahan yang akan dipergunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit. Sterilisasi dilakukan dengan cara membungkus alat dan bahan menggunakan aluminium foil.

3.4.2 Peremajaan Bakteri Endofit

Setiap akan memulai perlakuan, bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. Pseudomallei*, *K. ozaenae*) harus diremajakan terlebih dahulu pada media lempeng agar dan TSA miring, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

3.4.3 Uji aktivitas Enzim Kitinase

a. Pembuatan Koloidal Kitin (Sebagai Substrat dalam Pengukuran Aktivitas Kitinase) dengan cara hidrolisis parsial

Koloidal kitin dapat dibuat dengan cara hidrolisis parsial menggunakan metode Rodriguez-kabana *et al.*, (1983) dalam Yurnaliza, (2002) yaitu dengan cara 20 gram serbuk kitin (*Crab Shell Chitin*) dilarutkan dalam beaker glass yang berisi 180 ml HCl 10N, kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnetic selama 1,5-2 jam sehingga menjadi suspensi kitin. Selanjutnya suspensi kitin dituang kedalam Erlenmeyer berisi 2 liter air dan didiamkan selama semalam pada suhu 4°C, kemudian bagian bening dipisahkan dari endapannya. Selanjutnya disuspensi dengan 100 ml aquades dan pH-nya dinetralkan dengan NaOH 10 N sampai mencapai pH 6,8-7 dengan menggunakan pH meter. Setelah itu suspensi kitin tersebut disentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit sampai berbentuk pellet. Kemudian diresuspensi ulang dengan aquades, lalu disentrifus lagi untuk menghilangkan sisa garam. Sebelum digunakan pellet hendaknya disimpan pada suhu 4°C Pellet yang dihasilkan melalui proses ini disebut koloidal kitin. Untuk lebih jelasnya skema kerja dapat dilihat pada lampiran 8.

b. Pembuatan Media Agar Kitin

Kultur bakteri yang digunakan dalam percobaan ini diuji daya kitinolitiknya menggunakan media agar kitin dengan bahan sebagai berikut:

Koloidal kitin 0,2%; K_2HPO_4 0,7 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g; KH_2PO_4 0,3 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g; $ZnSO_4$ 0,001 g; $MnCl_2$ 0,001 g; agar 2% (b/v). Cara pembuatannya semua bahan dicampur kemudian ditambahkan akuades sampai volumenya menjadi 1 liter. selanjutnya media disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit pada tekanan 15 psi (Singh *et al.*, 1999 dalam Yurnaliza, 2002).

c. Uji Daya Kitinolitik Kultur Bakteri Endofit

Uji daya kitinolitik bakteri endofit dilakukan dengan langkah sebagai berikut: Menuang media kitin agar cair ke dalam cawan petri dengan ketebalan media ? 5 ml, kemudian didiamkan selama beberapa menit sampai media kitin agar memadat. Selanjutnya bagian luar cawan petri dibagi menjadi tiga bagian. Bakteri endofit tunggal diinokulasikan pada media agar kitin dengan cara ditotol pada permukaan media, sedangkan bakteri endofit kombinasi diinokulasikan pada media kitin agar dengan cara; bakteri A ditotolkan pada media kitin agar dengan menggunakan tusuk gigi steril, lalu dengan tusuk gigi yang lain diambil bakteri B dan totolkan pada media dan tempat yang sama dimana bakteri A ditotolkan. untuk mempermudah perlakuan terlebih dahulu bagian luar cawan ditandai berupa titik dengan menggunakan spidol marker. Selanjutnya cawan dibungkus rapat dengan menggunakan plastic warp, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari, setelah itu Diamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri dan diukur diameternya dengan menggunakan penggaris. Kemudian dihitung

indeks kitinolitiknya dengan cara menghitung perbandingan antara zona bening dengan koloni bakteri.

3.4.4 Uji aktivitas enzim protease

Aktivitas enzim protease dapat di uji secara kualitatif dari terbentuknya zona bening disekitar isolat yang ditumbuhkan pada media susu skim agar (Amelia *et al*, 2005).

a. Pembuatan media SMA (*Skim Milk Agar*)

Pembuatan media SMA dilakukan dengan cara melarutkan 20 gram susu skim dalam 250 ml akuades steril. Kemudian susu di pasteurisasi pada suhu 80 °C dan suhu tersebut dipertahankan selama 30 menit dengan menggunakan thermometer (pasteurisasi ini diulang sampai tiga kali agar bakteri yang terdapat didalamnya mati). Secara terpisah larutkan 5 g tripton, 2,5 g *yeast extract*, 1,0 g dextrose, dan 20 g agar batang dalam 750 ml akuades, kemudian di sterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 15 psi. susu skim yang telah dipasteurisasi dan bahan-bahan yang telah di seterilisasi langsung dicampurkan dalam keadaan steril. Media yang telah tercampur selanjutnya di tuang kedalam cawan petri ? 5 ml, dibiarkan dingin lalu disimpan selama semalam pada lemari es (Amelia *et al*, 2005), skema kerja dapat dilihat pada lampiran 9.

b. Uji Daya Proteolitik Kultur Bakteri Endofit

Pengujian aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit dapat dilakukan dengan langkah sebagai berikut: media SMA dalam cawan dikeluarkan dari kulkas dan dibiarkan selama beberapa menit sampai media tidak dingin lagi, Bagian luar cawan petri dibagi menjadi tiga bagian, kemudian bakteri endofit tunggal diinokulasikan pada media SMA dengan cara ditotol pada permukaan media, sedangkan bakteri endofit kombinasi diinokulasikan pada media SMA dengan cara; bakteri A ditotolkan pada media kitin agar dengan menggunakan tusuk gigi steril, lalu dengan tusuk gigi yang lain diambil bakteri B dan ditotolkan pada media dan tempat yang sama dimana bakteri A ditotolkan. Untuk mempermudah perlakuan terlebih dahulu bagian luar cawan di tandai berupa titik dengan menggunakan spidol marker. Selanjutnya cawan dibungkus rapat dengan menggunakan plastic wrap, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu diamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri dan diukur diameternya dengan menggunakan penggaris, lalu dihitung indeks proteolitiknya dengan cara menghitung perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri (Amelia *et al.*, 2005).

3.4.5 Uji Aktivitas Enzim Selulase

a. Pembuatan Media CMC (Carboxy-Methyl Cellulose) Agar

Pembuatan media CMC agar dilakukan dengan cara mencampurkan bahan carboxy methyl cellulose 5 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄. 7H₂O 5 g/l, yeast

extract 2 g/l, agar 15 g/l (Apun, 2007). Bahan yang telah tercampur selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° selama 15 menit dengan tekanan 15 psi.

b. Uji Daya Selulolitik Kultur Bacteri Endofit

Uji daya kitinolitik bakteri endofit dilakukan dengan langkah sebagai berikut: menuang media CMC agar cair ke dalam cawan petri dengan ketebalan media ? 5 ml, media di diamkan selama beberapa menit sampai CMC agar memadat, lalu bagian luar cawan petri dibagi menjadi tiga bagian. Bakteri endofit tunggal diinokulasikan dengan cara ditotol pada permukaan media, sedangkan bakteri endofit kombinasi diinokulasikan pada media CMC agar dengan cara; bakteri A di totolkan pada media kitin agar dengan menggunakan tusuk gigi steril, lalu dengan tusuk gigi yang lain diambil bakteri B dan totolkan pada media dan tempat yang sama dimana bakteri A ditotolkan. untuk mempermudah perlakuan terlebih dahulu bagian luar cawan di tandai berupa titik dengan menggunakan spidol marker, selanjutnya cawan dibungkus rapat dengan menggunakan plastik wreb, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah itu cawan yang berisi bakteri endofit di tetesi dengan larutan *congo red* 0,1%, di diamkan selama 30-60 menit, lalu Smedia dicuci dengan menggunakan NaCl 1 M untuk meghilangkan sisa-sisa warna pada media. Diamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri dan diukur diameternya dengan menggunakan penggaris. Kemudian dihitung indeks selulolitiknya dengan

cara menghitung perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri.

3.5 Pengumpulan data

Data diperoleh dengan cara mengukur diameter zona bening dan diameter koloni dengan menggunakan penggaris. Besarnya aktivitas enzim secara relatif bergantung pada besarnya indeks enzim yang dihasilkan oleh bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*). Indeks enzim merupakan hasil bagi antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengukuran Aktivitas Hidrolitik Enzim Kitinase yang Dihasilkan Oleh Bakteri Endofit secara Kualitatif.

Aktivitas hidrolitik enzim kitinase secara kualitatif dapat diukur dengan cara menumbuhkan bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) pada media kitin agar yang terdiri dari garam minimal dan koloidal kitin 0,2% selama 5 hari pada suhu ruang. Adanya aktivitas hidrolitik enzim kitinase ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Adapun hasil pengamatan aktivitas bakteri endofit berdasarkan terbentuknya zona bening enzim kitinase dapat dilihat pada lampiran 1.

Berdasarkan hasil pengamatan pada lampiran 1, menunjukkan bahwa seluruh bakteri endofit yang ditumbuhkan pada media kitin agar baik perlakuan tunggal maupun kombinasi sama-sama dapat menghidrolisis substrat kitin yang terdapat pada media. Hal ini dapat dilihat dari terbentuknya zona hidrolisis di sekitar koloni bakteri endofit. Diameter zona hidrolisis atau zona bening ini kemudian diukur indeks enzim kitinasenya dengan cara membandingkan antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri (Nasran *et al.*, 2003;34). Besarnya Indeks enzim menunjukkan besarnya aktivitas nisbi enzim (Suryanto dan Munir, 2006). Adapun hasil pengukuran indeks enzim kitinolitik bakteri endofit dapat dilihat pada lampiran 2.

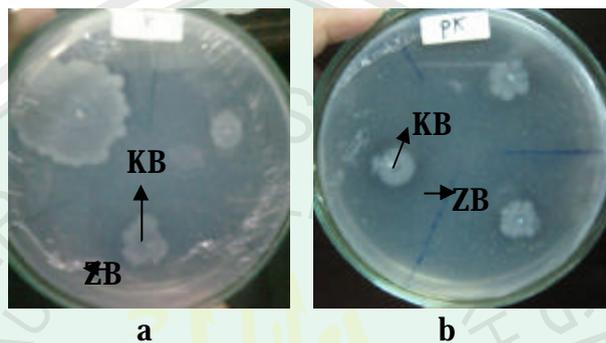
Dari hasil pengukuran aktivitas kitinase pada lampiran 2, besarnya indeks kitinase yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri endofit baik tunggal maupun kombinasi selanjutnya di rata-ratakan untuk memperoleh indeks kitinase total. Adapun hasil rata-rata Indeks Kitinase (IK) dapat dilihat pada tabel 4.1. di bawah ini:

Tabel 4.1 Rata-rata Indeks Kitinase yang Dihasilkan oleh Bakteri Endofit

Bakteri Endofit	Aktivitas Enzim Kitinase / Indeks Kitinase (IK)			Rata-rata Indeks Kitinase
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Kontrol	-	-	-	-
<i>B. mycooides</i>	1,13	1,14	1,30	1,19
<i>P. pseudomallei</i>	1,17	1,14	1,18	1,16
<i>K. ozaenae</i>	1,20	1,29	1,12	1,20
<i>B. mycooides, P. pseudomallei</i>	1,10	1,09	1,18	1,12
<i>B. mycooides, K. ozaenae</i>	1,10	1,07	1,08	1,08
<i>P. pseudomallei, K. ozaenae</i>	1,38	1,50	1,42	1,43
<i>B. mycooides, P. pseudomallei dan K. ozaenae</i>	1,10	1,07	1,06	1,08

Berdasarkan tabel hasil pengamatan 4.1, diketahui bahwa bakteri endofit tunggal yang memiliki aktivitas kitinase terbesar adalah *K. ozaena* dengan Indeks kitinase sebesar 1,2, kemudian diikuti oleh *B. mycooides* dan *P. pseudomallei* dengan Indeks kitinase sebesar 1,19 dan 1,16. Sedangkan pada bakteri endofit kombinasi, aktivitas kitinase tertinggi dijumpai pada kombinasi *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* dengan indeks kitinase sebesar 1,43, kemudian diikuti oleh kombinasi *B. mycooides, P. pseudomallei* dengan Indeks Kitinase sebesar 1,12; *B. mycooides* dengan *K. ozaenae* dan kombinasi ketiganya *B. mycooides, P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* memiliki indeks

kitinase yang sama besar yaitu 1,08. Kontrol merupakan media yang tidak ditumbuhi bakteri endofit, sehingga tidak terdapat aktivitas enzim pada media tersebut. Aktivitas kitinase tertinggi pada bakteri tunggal dan kombinasi dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 4.1. a. Bakteri endofit *K.ozaenae*. b. Bakteri endofit kombinasi *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* keduanya menunjukkan aktivitas kitinase setelah ditumbuhkan pada media kitin agar selama 120 jam. (ZB = Zona Bening, KB = Koloni Bakteri).

Kemampuan bakteri endofit tunggal *K. ozaenae* dalam menghidrolisis substrat kitin yang terdapat dalam media kitin agar berdasarkan indeks kitinase yang dihasilkannya tergolong sedang yaitu 1,2, demikian juga pada bakteri kombinasi *P. pseudomallei* dengan *K. ozaena* kemampuan dalam menghidrolisis substrat kitin juga tergolong sedang yaitu 1,43. Hal ini sesuai dengan standar reaksi enzim ekstraseluler yang dikemukakan oleh Choi *et al.* (2005) yang dapat dilihat pada lampiran 7.

Kecilnya reaksi enzim kitinase yang dihasilkan dari tiap spesies bakteri endofit (*B. mycoides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) ini, baik tunggal maupun kombinasi diduga disebabkan oleh perbedaan suhu, pH dan jumlah substrat baik pada kondisi alami maupun perlakuan di laboratorium selama

penelitian berlangsung. Enzim memerlukan pH lingkungan yang sesuai untuk aktivitas optimalnya. Perubahan pH lingkungan diperkirakan akan menyebabkan perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim dengan substrat, sehingga aktivitas enzim akan menurun. Umumnya enzim kitinase bekerja optimal pada kisaran pH asam hingga netral. Kitinase *Bacillus* K29-14 bekerja optimal pada pH 7.0, *P. aeruginosa* K-187 pada pH 7.0 dan 8.0 (Wang dan Chang, 1997).

Adanya perubahan aktivitas enzim ini menunjukkan adanya hukum keseimbangan alam. Allah berfirman dalam QS. Al-Mulk ayat : 3 sebagai berikut ini:

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوُّتٍ فَارْجِعِ الْبَصَرَ 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: 3)

Ayat ini menjelaskan bahwa keteraturan fenomena Alam, dengan segala pola, ketersusunan dan perbedaannya menunjukkan adanya eksistensi pencipta yaitu Allah. Keteraturan ini juga terjadi pada enzim dimana untuk dapat bekerja secara optimal dibutuhkan pengaturan yang seimbang antara jumlah substrat, enzim, pH, dan suhu lingkungan, sehingga apabila kondisi tersebut tidak memenuhi dengan kata lain tidak seimbang maka aktivitas kerja enzim akan menurun (Rosidi, 2008).

Suhu juga dapat mempengaruhi aktivitas bakteri kitinolitik dalam menghasilkan enzim kitinase. Menurut Nasran *et al.* (2003) bakteri kitinolitik dapat memproduksi enzim kitinase secara optimal pada suhu kamar (28-31 °C), karena pada suhu ini bakteri sangat cepat melakukan adaptasi pada periode starter. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lehninger (1998) bahwa aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, Konsentrasi substrat dan enzim, suhu, dan adanya aktivator atau inhibitor.

Dari beberapa faktor tersebut menyebabkan penelitian ini berbeda hasilnya dengan penelitian sebelumnya Wardhani (2009) yang telah menguji kemampuan bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae*) secara *in vitro* dalam melisiskan dinding sel nematoda sista kuning (NSK) yang sebagian besar tersusun atas kitin, kemampuan bakteri endofit tersebut dalam mendegradasi sista nematoda dianggap sangat baik karena masing-masing bakteri mampu melisiskan telur nematoda sebesar 87,70%, 78,44%, 58,66%. Secara *in vivo* *Klebsiella ozaenae* mampu menghambat dan membunuh larva nematoda, dengan presentasi sista yang menempel pada tanaman sebanyak 9%, dan pada kombinasi *B. Mycooides*, *P. Pseudomallei* dan *K. ozaenae* sebanyak 10% dan mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman kentang (Juwita, 2010). Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan enzim kitinase pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hal tersebut diduga disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan bakteri endofit dalam mengenali struktur

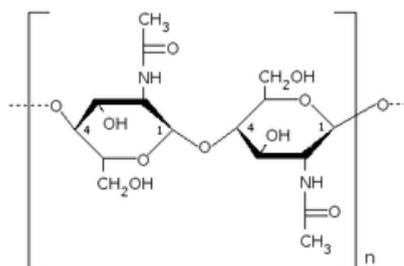
kitin yang terdapat dalam lapisan kutikula nematoda dengan substrat kitin yang terdapat pada media agar kitin.

Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan enzim ekstraseluler seperti kitinase. sebenarnya sudah ada dalam Al-Qur'an surat Al-An'am: 95 sebagai berikut:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۖ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۚ تُوَفَّقُونَ

Artinya.” Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka mengapa kamu masih berpaling? (QS. Al-An'am: 95).

Kata “ dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup” yang dimaksud dalam ayat tersebut adalah senyawa bioaktif atau enzim ekstraseluler yang mampu dihasilkan oleh bakteri endofit. Nasran *et al.* (2003) menjelaskan bahwa beragamnya kemampuan bakteri menghasilkan berbagai jenis kitinase dan enzim pendegradasi kitin lainnya kemungkinan merupakan upaya penyesuaian terhadap beragamnya jenis, tipe, dan struktur kitin yang tersedia di alam. Satu unit struktur kitin dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Struktur Kitin (Yurnaliza, 2002)

Produksi enzim kitinase oleh *B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* dipengaruhi oleh sumber karbon dan nitrogen yang ada di dalam media dan dirangsang dengan pH asam dan NaNO_3 (Tweddell *et al.*, 1994 dalam Asni, 2008). Pengaturan sintesis kitinase dipengaruhi juga oleh produk akhir (katabolit) berupa N-asetilglukosamin dan glukosa. Faktor lain yang menginduksi sintesis kitinase adalah kemampuan sel mikroorganisme untuk mengenal struktur fisik kitin seperti susunan rantai (Yurnaliza, 2002).

Selain itu variasi aktifitas kitinase yang dihasilkan oleh *B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* juga dipengaruhi oleh jenis dan komposisi media, fase pertumbuhan bakteri itu sendiri, dan kemampuan bakteri dan koloninya dalam mengekskresikan enzim. Variasi ini tidak saja terlihat dari jumlah aktivitas kitinase total yang diproduksi setiap spesiesnya, tetapi juga pada jenis kitinase yang dihasilkan (Dewi, 2008).

Enzim kitinase digunakan oleh bakteri endofit untuk memecah kitin menjadi sumber karbon dan nitrogen. Unsur tersebut merupakan nutrisi dasar yang dibutuhkan mikroba untuk melakukan pertumbuhan. Allah berfirman dalam Al-Quran surat Al-Maidah; 88 dibawah ini:

وَكُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلَالًا طَيِّبًا ۗ وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي أَنْتُمْ بِهِ مُؤْمِنُونَ ﴿٨٨﴾

Artinya. “dan makanlah makanan yang halal lagi baik dari apa yang Allah telah rezezikkan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepada-Nya” (QS. Al-Maidah: 88).

Ayat ini menjelaskan bahwa setiap makhluk hidup memiliki kebutuhan nutrisi yang berbeda-beda untuk pertumbuhannya, sebagaimana

bakteri endofit yang membutuhkan unsure hara tertentu untuk dapat memenuhi kebutuhan hidupnya. Adapun asupan gizi makhluk hidup tersebut telah ditetapkan sesuai dengan kadar dan ukurannya.

Umumnya enzim kitinase dapat dihasilkan oleh bakteri pada fase eksponensial. Karena enzim merupakan metabolit primer dari hasil metabolisme bakteri. Metabolit primer adalah senyawa yang termasuk produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba (Wardhani, 2009).

Berdasarkan reaksi enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri endofit tunggal *K. ozaenae* dan bakteri kombinasi *P. pseudomallei* dengan *K. ozaenae* yang terbentuk pada uji nisbi (Gambar 4.1), menunjukkan bahwa fase pertumbuhan bakteri endofit (*B. mycoides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*), tersebut memiliki fase lag yang panjang sebelum sampai ke fase log (Dewi, 2008). Hal ini dapat dilihat dari kemampuan bakteri membentuk zona hidrolisis pada media agar kitin setelah diinkubasi selama 5 hari. Diameter zona bening dan koloni bakteri terus bertambah dan berhenti pada hari ke-14.

Menurut Yurnaliza (2001) beberapa faktor seperti perbedaan jenis mikroba, kecepatan pertumbuhan setiap isolat pada medium padat dan cair, jumlah inokulum yang diberikan pada kedua medium, dan tipe enzim kitinase yang dihasilkan, diduga menjadi penyebab tidak berkorelasinya nilai aktivitas hidrolisis secara kualitatif dengan nilai aktivitas secara kuantitatif.

4.2 Pengukuran Aktivitas Hidrolitik Enzim Protease yang Dihasilkan oleh Bakteri Endofit Secara Kualitatif

Kemampuan bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) dalam menghasilkan enzim protease dapat diketahui dengan cara menumbuhkan bakteri pada media susu skim agar (*Skim Milk Agar*) selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada pembuatan media SMA (*Skim Milk Agar*), susu skim yang akan digunakan harus di pasteurisasi terlebih dahulu. Pasteurisasi adalah proses pemanasan susu di bawah titik didihnya untuk mematikan beberapa mikroba *patogen*. Pasteurisasi ini dilakukan pada suhu 80°C tiga kali selama 30 menit dengan menggunakan thermometer sebagai alat pengukur suhunya. Selain itu jika susu tidak di pasteurisasi tetapi langsung diautoklaf bersama dengan media lainnya, maka protein susu akan terdenaturasi dan menghambat pengamatan terhadap aktivitas protease (Amelia *et al.*, 2005).

Setelah bakteri ditumbuhkan pada media SMA selama 24 jam pada suhu 37 °C, zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri diamati. Penggunaan suhu 37 °C dan waktu inkubasi 24 jam tersebut dikarenakan bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) ini termasuk bakteri mesofilik yang mampu tumbuh baik pada kisaran suhu 20°C – 40°C dan memiliki suhu pertumbuhan optimum 37 °C, karena pada umumnya temperatur optimum itu lebih mendekati temperature maksimum dari pada temperature minimum. sedangkan digunakan waktu inkubasi 24 jam karena ketiga bakteri tersebut memiliki pertumbuhan yang cepat pada media SMA

sehingga pada waktu 24 jam tersebut diperkirakan bakteri sudah masuk pada fase eksponensial, selain itu pada waktu inkubasi diatas 20 jam, bakteri-bakteri lain (bakteri susu) mulai muncul dan mengkontaminasi media, sehingga dapat mengganggu pengamatan.

Menurut Buckle, K.A. *et al.* (1985), lama waktu inkubasi berkaitan dengan waktu pertumbuhan optimum untuk setiap bakteri berbeda bergantung pada masing-masing spesies. Kelompok bakteri *Pseudomonaceae*, *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae* merupakan kelompok bakteri yang mempunyai kecepatan tumbuh tinggi.

Allah telah menetapkan segala sesuatu sesuai dengan kadar dan ukurannya sebagaimana yang dijelaskan dalam Al-Qur'an surat Al-Qamar: 49 sebagai berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya. "Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran" (QS. Al-Qamar: 49).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah telah menciptakan segala sesuatu menurut ukurannya. Seperti Allah menciptakan Beraneka macam jenis bakteri yang memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda-beda bergantung pada kadar kemampuannya.

Bakteri endofit mampu menghasilkan enzim protease setelah diinkubasi selama 24 jam, Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa substrat protein yang terdapat pada media susu skim telah dipecah menjadi peptida sederhana dan asam amino oleh enzim protease. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua bakteri endofit baik

perlakuan tunggal maupun kombinasi dapat menghasilkan enzim protease sebagaimana yang ditunjukkan pada lampiran 3.

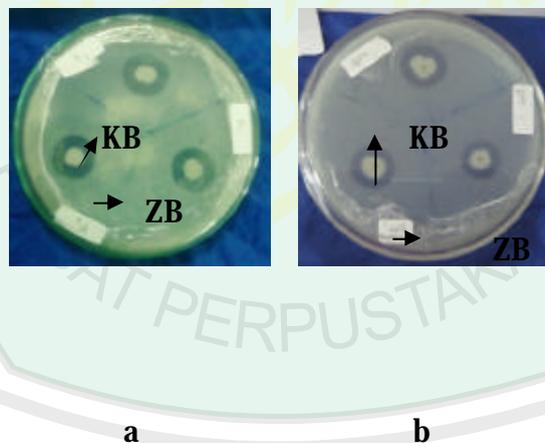
Besarnya aktivitas protease nisbi / indek protease yang dihasilkan bakteri endofit baik perlakuan tunggal maupun kombinasi dapat diketahui dengan cara mengukur diameter zona bening dan koloni bakteri dengan menggunakan penggaris, kemudian dihitung indeks proteolitiknya dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Indeks protease (IP) merupakan aktivitas enzim protease secara nisbi. Semakin besar IP yang dihasilkan oleh bakteri endofit, maka zona bening yang terbentuk juga akan semakin lebar. Data hasil pengukuran aktivitas protease dapat dilihat pada lampiran 4.

Dari hasil pengukuran tersebut, indeks protease masing-masing bakteri endofit kemudian dirata-ratakan untuk mengetahui besarnya aktivitas total enzim protease yang dihasilkannya. Besarnya aktivitas total enzim protease dapat dilihat pada tabel 4.2 dibawah ini:

Tabel 4.2 Rata-rata Indeks Protease yang Dihasilkan oleh Bakteri Endofit

Bakteri endofit	Aktivitas Enzim Protease / Indeks Protease (IP)			Rata-rata Indeks Protease
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Kontrol	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i>	1,78	1,80	1,80	1,79
<i>P. pseudomallei</i>	2,11	1,77	1,61	1,83
<i>K. ozaenae</i>	2,00	2,13	2,11	2,08
<i>B. mycoides, P. pseudomallei</i>	1,78	2,00	1,78	1,85
<i>B. mycoides, K. ozaenae</i>	1,70	1,80	1,64	1,71
<i>P. pseudomallei, K. ozaenae</i>	1,88	2,00	1,56	1,81
<i>B. mycoides, P. pseudomallei, dan K. ozaenae</i>	1,60	2,25	1,67	2,76

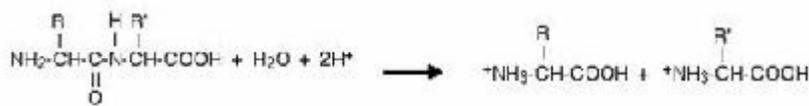
Berdasarkan tabel 4.2 *K. ozaenae* merupakan bakteri endofit tunggal yang memiliki aktivitas protease tertinggi yaitu sebesar 2,08, diikuti oleh *Pseudomallei* dan *B. mycooides* dengan aktivitas sebesar 1,85 dan 1,79. Sedangkan pada perlakuan kombinasi bakteri endofit yang memiliki aktivitas protease tertinggi adalah pada kombinasi *B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae* dengan aktivitas protease sebesar 2,76, diikuti oleh *B. mycooides* dan *P. pseudomallei*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* dan *B. mycooides* dan *K. ozaenae* dengan indek protease sebesar 1,85; 1,81 dan 1,71, sedangkan kontrol merupakan media yang tidak ditumbuhi oleh bakteri endofit sehingga tidak terdapat zona bening pula. Aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 4.3. a. Bakteri tunggal *K. ozaenae*, b. Bakteri kombinasi *B. mycooides*, *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae*. keduanya menunjukkan aktivitas protease pada media SMA setelah diinkubasi selama 24 jam. (KB= Koloni Bakteri endofit, ZB= Zona Bening) enzim protease.

Pada dasarnya semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua bakteri mempunyai enzim protease ekstraseluler (Fardiaz, 1992), Sebagaimana yang dimiliki oleh *Bacillus mycooides*, *P.*

pseudomallei dan *K. ozaenae*. enzim protease yang dihasilkan ini mampu memecah protein kasein yang terdapat pada susu skim menjadi peptide-peptida yang lebih sederhana dan asam amino. oleh karena itu enzim protease disebut juga peptidase (Abdul, 2009). Proses hidrolisis ini dinamakan peptonisasi atau proteolisis. Sebagaimana ditunjukkan pada reaksi dibawah ini:



Gambar 4.4 . Proses Proteolisis Enzim Protease Menjadi Asam Amino (Abdul, 2009)

Umumnya bakteri endofit dapat menghasilkan enzim-enzim ekstraseluler seperti protease, kitinase dan selulase pada fase eksponensial (Nasran *et al.*, 2003). Fase ini merupakan fase perbanyakan sel dimana bakteri melakukan konsumsi nutrisi untuk memenuhi kebutuhannya. Sehingga berbagai macam proses fisiologi dapat terjadi pada fase ini (Purwoko, 2007).

Makanan dan nutrisi seluruh makhluk hidup di dunia ini telah dijamin oleh Allah, diterangkan dalam QS. Al-Huud: 06 sebagai berikut:

﴿ وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ إِلَّا عَلَى اللَّهِ رِزْقُهَا وَيَعْلَمُ مُسْتَقَرَّهَا وَمُسْتَوْدَعَهَا كُلٌّ فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴾

﴿ مَبِينٍ ﴾

Artinya. “Dan tidak ada suatu binatang melata pun di bumi melainkan Allah-lah yang memberi rezkinya, dan Dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya. semuanya tertulis dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)” (QS. Al-Huud, 11: 06).

Ayat tersebut menjelaskan tentang rizki dan makanan seluruh makhluk hidup di dunia ini yang telah dijamin oleh Allah. Seperti terpenuhinya nutrisi bakteri endofit yang berada di dalam tubuh tanaman. Nutrisi bakteri endofit dapat diperoleh dengan cara menghasilkan enzim ekstraseluler seperti kitinase yang memecah kitin menjadi N-asetil glukosamin, Protease yang memecah protein menjadi asam amino dan selulase yang memecah selulosa menjadi gula sederhana yang dapat dimanfaatkan langsung oleh bakteri. Bakteri endofit memenuhi nutrisinya untuk tumbuh dan berkembangbiak.

Besarnya aktivitas proteolitik bakteri kombinasi dibandingkan bakteri tunggal berkaitan dengan seiring meningkatnya populasi bakteri pada media SMA. Hal ini menyebabkan aktivitas pemecahan substrat protein yang terdapat dalam media meningkat pula, sehingga kultur kombinasi ini mampu menghidrolisis substrat yang lebih besar dari pada kultur bakteri tunggal. Sumastri (2009) menyatakan bahwa kultur campuran (kombinasi) bakteri mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon alifatik, aromatik, asfaltin, dan senyawa fraksi nitrogen, sulfur, dan oksigen pada tanah yang tercemar minyak bumi dan lumpur minyak bumi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa biodegradasi dengan kultur campuran bakteri memberikan hasil yang lebih tinggi daripada kultur satu jenis bakteri, tetapi diperlukan kombinasi campuran bakteri yang dinamis dan sinergis.

Jika dua atau lebih jasad yang berbeda ditumbuhkan bersama-sama dalam suatu medium, maka aktivitas metabolismenya secara kualitatif maupun kuantitatif akan berbeda jika dibandingkan dengan jumlah aktivitas

masing-masing jasad yang ditumbuhkan dalam medium yang sama tetapi terpisah. Fenomena ini merupakan hasil interaksi metabolisme atau interaksi dalam penggunaan nutrisi yang dikenal sebagai sinergistik (Sumarsih, 2003).

Sebagai contoh ialah bakteri penghasil metan yang anaerob obligat tidak dapat menggunakan glukosa sebagai substrat, tetapi bakteri tersebut akan segera tumbuh oleh adanya hasil metabolisme bakteri anaerob lain yang dapat menggunakan glukosa. Contoh lain ialah biakan campuran yang terdiri atas dua jenis mikroba atau lebih sering tidak memerlukan faktor tumbuh untuk pertumbuhannya. Mikroba yang dapat mensintesis bahan selnya dari senyawa organik sederhana dalam medium, akan mengekskresikan berbagai vitamin atau asam amino yang sangat penting untuk mikroba lainnya. Adanya ekskresi tersebut memungkinkan tumbuhnya mikroba lain. Kenyataan ini dapat menimbulkan koloni satelit yang dapat dilihat pada medium padat. Koloni satelit hanya dapat tumbuh kalau ada ekskresi dari mikroba lain yang menghasilkan faktor tumbuh esensial bagi mikroba tersebut. bentuk interaksi ini disebut *cross feeding* karena dalam interaksi ini pertumbuhan jasad yang satu tergantung pada pertumbuhan jasad lainnya (Sumarsih, 2003)

4.3 Pengukuran Aktivitas Hidrolitik Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh Bakteri Endofit Secara Kualitatif

Aktivitas enzim selulase dapat diukur dengan cara menumbuhkan bakteri endofit pada media CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) agar. Selanjutnya bakteri di inkubasi pada suhu ruang selama 2 hari. Setelah inkubasi selama 2 hari.

Media yang ditumbuhi bakteri endofit ditetesi dengan menggunakan *congo red* dan didiamkan selama 30 menit, tujuannya agar zona bening yang terbentuk akibat hidrolisis selulolitik dapat terlihat jelas. *Congo red* merupakan senyawa yang dapat bereaksi kuat dengan polisakarida yang mengandung ikatan β ,1-4 dari unit D-glukopiranososa. Bahan ini juga berperan penting dalam hidrolisis polisakarida, membentuk kompleks warna yang tidak terhidrolisis (Hendricks *et al.*, 1995 dalam Luthfiyah, 2008).

Setelah ditetesi dengan menggunakan *congo red* dan didiamkan selama 30 menit kemudian media dicuci dengan menggunakan larutan NaCl 1 M, tujuannya adalah untuk melunturkan sisa-sisa warna yang masih menempel pada media. Berdasarkan hasil pengamatan pada lampiran 5, seluruh bakteri endofit baik yang tunggal maupun kombinasi dapat menghasilkan enzim selulase. Hal ini diindikasikan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. sebagaimana dengan enzim kitinase dan protease, enzim selulase juga diukur indeks selulolitiknya untuk mengetahui aktivitas enzim selulase secara relatif. Adapun data hasil pengukuran enzim protease dapat dilihat pada lampiran 6.

Dari perolehan data tersebut, indeks selulase masing-masing bakteri endofit baik tunggal maupun kombinasi selanjutnya di rata-ratakan untuk mengetahui besarnya nilai aktivitas total enzim selulase yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri. Semakin besar indeks selulase yang dihasilkan oleh bakteri endofit maka semakin besar pula zona hidrolitik enzim selulase pada

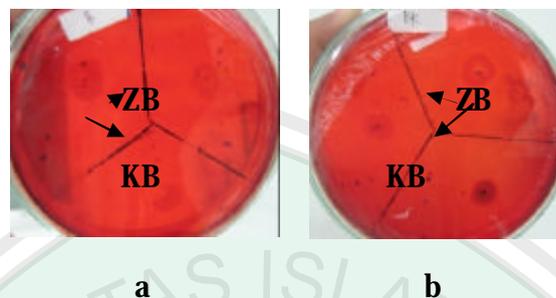
media CMC-agar. Adapun nilai aktivitas enzim selulase berdasarkan rata-rata indeks selulase bakteri endofit dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4. 3. Rata-rata Indeks Selulase yang Dihasilkan oleh Bakteri Endofit

Bakteri Endofit	Aktivitas Enzim Selulase / Indeks Selulase (IS)			Rata-rata Indeks Selulase
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Kontrol	-	-	-	-
<i>B. mycooides</i>	1,23	1,25	1,27	1,25
<i>P. pseudomallei</i>	1,12	1,12	1,15	1,13
<i>K. ozaenae</i>	1,27	1,21	1,23	1,24
<i>B. mycooides, P. pseudomallei</i>	1,23	1,19	1,23	1,22
<i>B. mycooides, K. ozaenae</i>	1,25	1,36	1,27	1,29
<i>P. pseudomallei, K. ozaenae</i>	1,20	1,18	1,25	1,21
<i>B. mycooides, P. pseudomallei, dan K. ozaenae</i>	1,27	1,25	1,11	1,21

Dari hasil rata-rata indeks selulolitik bakteri endofit pada tabel 4.3 diatas. Dapat diketahui bahwa bakteri yang memiliki aktivitas selulolitik tertinggi adalah *B. mycooides* untuk perlakuan tunggal dengan indeks selulase sebesar 1,25, sedangkan untuk perlakuan kombinasi aktivitas selulolitik tertinggi adalah kombinasi *B. mycooides* dan *K. ozaenae* dengan indeks selulase sebesar 1,29. Pada perlakuan kontrol tidak ditemukan zona bening. Kontrol merupakan media CMC yang tidak ditumbuhi bakteri endofit. dari data tersebut dapat diketahui bahwa reaksi enzim selulase yang terbentuk pada media CMC agar relative sedang, yaitu berkisar antara 1-2. Menurut Choi *et al.*, (2005) aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri dikatakan memiliki reaksi sedang apabila aktivitas enzim yang dihasilkan kurang dari 2 akan tetapi lebih dari 1. aktivitas hidrolitik enzim selulase yang dihasilkan oleh

bakteri endofit tunggal dan kombinasi dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 4.5. a. Bakteri tunggal *Bacillus mycooides*, b. Bakteri kombinasi *B. mycooides* dan *K. ozaenae*. keduanya menunjukkan aktivitas selulolitik pada media CMC-agar setelah 24 jam. (ZB = zona bening, KB = koloni bakteri)

Gambar 4.5 di atas menunjukkan kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan enzim selulase. Zona bening yang terbentuk pada media CMC agar setelah ditetesi dengan *congo red* dan dicuci dengan NaCl 1 M, ditunjukkan dengan terbentuknya warna orange yang lebih muda dari warna media yang melingkar di sekitar koloni bakteri.

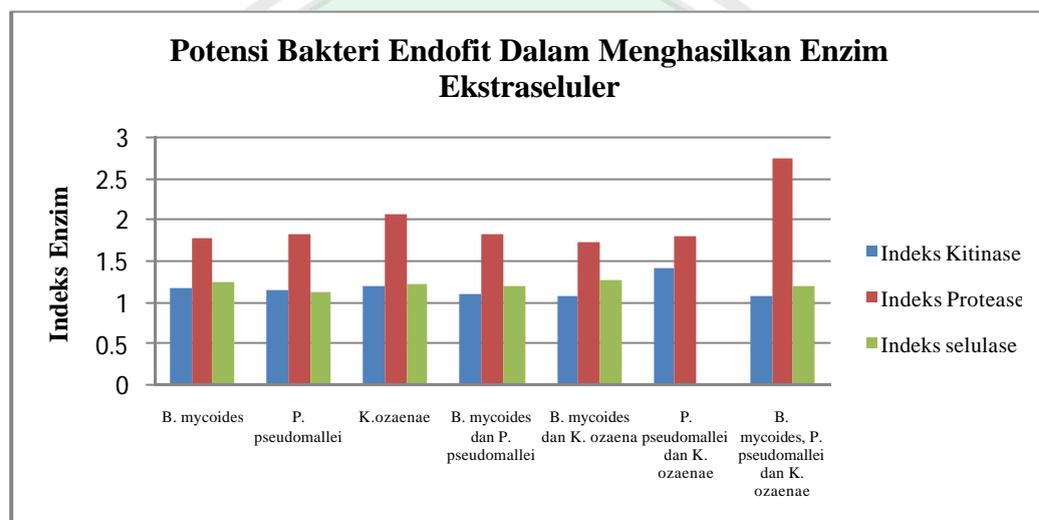
Penampilan bakteri endofit tunggal *B. mycooides* dan kombinasi *B. mycooides* dan *K. ozaenae* dalam merombak substrat CMC-agar sebagaimana yang ditunjukkan pada gambar 4.5. Menunjukkan bahwa enzim selulase sangat aktif memutuskan turunan selulosa seperti CMC menghasilkan selodekstrin, selobiosa, dan glukosa. CMC-ase merupakan salah satu komponen kompleks enzim selulase yang menyerang secara acak bagian dalam selulosa. Aktivitas CMC-ase koloni bakteri tunggal *Bacillus mycooides* dan koloni campuran bakteri *B. mycooides* dan *K. ozaenae* pada media CMC-agar membentuk zona bening dibawah dan disekitar koloni bakteri. Aktivitas

enzim secara kualitatif dinilai dari intensitas warna orange dan semi kuantitatif dinilai dari rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni bakteri (Saraswati *et al.*, 2006). Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan (Maranata, 2002).

Enzim kitinase, protease, dan selulase memiliki peranan penting dalam induksi ketahanan tanaman dan juga sebagai agen biokontrol melawan nematoda, fungi, patogen dan hama tanaman. Meskipun kemampuan bakteri endofit *B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae* dalam menghasilkan enzim kitinase, protease dan selulase secara *in vitro* berbeda-beda, akan tetapi ketiga bakteri tersebut pernah diantagoniskan langsung terhadap nematoda sista kuning (*G. rostochiensis*) baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Secara *in vitro* bakteri tersebut mampu meningkatkan mortalitas larva nematoda secara berturut-turut sebesar 87,70%, 78,44%, 58,66%. (Wardhani, 2009). Secara *in vivo* *Klebsiella ozaenae* mampu menghambat dan membunuh larva nematoda, dengan presentasi sista yang menempel pada tanaman sebanyak 9%, dan pada kombinasi *B. Mycooides*, *P. Pseudomallei* dan *K. ozaenae* sebanyak 10% dan mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman kentang. (Juwita, 2010).

Untuk mengetahui bakteri endofit baik perlakuan tunggal maupun kombinasi yang berpotensi dalam menghasilkan enzim pertahanan (kitinase, protease, dan selulase) dapat dilihat pada gambar 4.6. pada gambar tersebut menunjukkan bahwa bakteri endofit yang berpotensi dalam menghasilkan

enzim pertahanan (kitinase, protease, dan selulase) pada bakteri tunggal adalah *K. ozaenae*, sedangkan pada perlakuan kombinasi bakteri yang berpotensi menghasilkan ketiga enzim tersebut adalah *B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae*. potensi tersebut dilihat dari tingginya aktivitas dalam menghasilkan ketiga enzim-enzim tersebut.



Gambar 4.6. Potensi Bakteri Endofit Dalam Menghasilkan Enzim Kitinase, Protease dan Selulase secara *in vitro*

Dari gambar 4.7 diatas diketahui bahwa perlakuan kombinasi ketiga bakteri endofit (*B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae*) lebih besar dari pada kemampuan bakteri satu jenis. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sumarsih (2003) bahwa jika terdapat dua atau lebih jasad yang berbeda ditumbuhkan bersama-sama dalam suatu medium, maka aktivitas metabolismenya secara kualitatif maupun kuantitatif akan berbeda jika dibandingkan dengan jumlah aktivitas masing-masing jasad yang ditumbuhkan dalam medium yang sama tetapi terpisah. Fenomena ini

merupakan hasil interaksi metabolisme atau interaksi dalam penggunaan nutrisi yang dikenal sebagai sinergitik.

Hubungan yang sinergistik ini terjadi dua spesies bakteri hidup bersama dan mengadakan kegiatan yang tidak saling mengganggu, akan tetapi kegiatan masing-masing justru berupa suatu urutan yang saling menguntungkan. Ragi (adonan) untuk membuat tape terdiri dari kumpulan spesies-spesies *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula* dan mungkin juga *Acetobacter*. Masing-masing spesies memiliki kegiatan sendiri-sendiri, sehingga zat tepung (amilum) dapat berubah menjadi gula, dan gula menjadi beberapa macam asam organik, alkohol, dan lain-lain (Dwijosaputro, 2006).

Interaksi sinergistik yang terjadi antara bakteri endofit *B. mycooides*, *P. pseudomallei*, dan *K. ozaenae* jika dikaitkan dalam hal metabolisme dan perolehan nutrisi dalam satu medium yaitu karena masing-masing bakteri tersebut memiliki potensi yang berbeda-beda dalam menghasilkan enzim ekstraseluler seperti kitinase, protease, dan selulase. Meskipun seluruh bakteri dapat menghasilkan ketiga enzim tersebut, akan tetapi potensi yang dimiliki masing-masing bakteri berbeda-beda. Hal tersebut dapat dilihat ketika ketiga bakteri tersebut dikombinasikan maka *K. ozaenae* akan mendominasi dalam hal perolehan nutrisi karena bakteri ini mampu mensekresikan enzim kitinase dan protease yang lebih besar dari pada bakteri lain, sehingga dari kemampuan tersebut *B. mycooides* dan *P. pseudomallei* dapat memanfaatkan hasil metabolismenya seperti asam amino dan gula sederhana. Sedangkan dalam perolehan karbon dan nitrogen *B.*

mycoides lebih mendominasi karena kemampuannya dalam menghasilkan enzim selulase. Selain itu kemampuan *Bacillus mycoides* dalam menghasilkan enzim selulase dapat dimanfaatkan dalam proses kolonisasi jaringan tumbuhan, sehingga *P. pseudomallei* dan *K. ozaenae* dapat lebih mudah masuk dan mengkolonisasi jaringan tanaman berkat selulase yang disekresikan *B. mycoides*.

Dari hasil analisa yang disebutkan diatas beberapa peranan bakteri endofit diantaranya *B. mycoides* berperan dalam hal penetrasi, multiplikasi dan kolonisasi jaringan tanaman dan menghambat jamur patogen yang tersusun atas selulosa. Kemampuan dalam menghasilkan selulase ini dimanfaatkan oleh *B. mycoides* dalam hal kompetisi makanan dan penguasaan ruang dengan mikroba patogen karena tidak semua mikroba dapat menghasilkan enzim selulase (Calfoun *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2010 dan Gao *et al.*, 2010). Sedangkan bakteri *K. ozaenae* bersamaan dengan *P. pseudomallei* berperan dalam hal pengendalian hama tanaman seperti nematoda, fungi patogen dan serangga, karena *K. ozaenae* memiliki kemampuan menghasilkan kitinase dan protease yang berfungsi mendegradasi lapisan kutikula nematoda, jamur dan serangga yang tersusun atas kitin dan protein (Pujiyanto *et al.*, 2008, Harni *et al.*, 2010 dan Yurnaliza, 2002).