

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* Linn. Cv. Granola).

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan pada bulan Juli sampai September 2009, didapatkan 3 isolat bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman kentang. Untuk mengetahui hasil isolat bakteri endofit yang berhasil ditumbuhkan pada media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dapat dilihat pada Gambar 4.1.






Gambar 4.1 Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit yang diisolasi dari Akar Tanaman Kentang pada Medium TSA

Hasil pengamatan pada Gambar 4.1 di atas, membuktikan bahwa bakteri endofit dapat ditemukan pada jaringan akar tanaman kentang.

Tabel 4.1 Hasil Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Kentang

Daerah Sampel	Letak Geografis	Jumlah Isolat	Kode Isolat
Desa Sumberbrantas Malang	Dataran Tinggi	3	BE1 BE5 BE6

Tabel 4.2 Deskripsi Bentuk dan Warna Koloni Isolat Bakteri Endofit

Kode Isolat	Ciri Makroskopis	Foto Hasil Pengamatan
BE1	Koloni bakteri berbentuk bulat, tepi rata, halus mengkilat dan mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan sampai orange pada medium TSA. Secara individu bakteri berbentuk batang.	
BE5	Koloni bakteri pada umumnya berbentuk seperti benang (<i>filamentous</i>). Koloni bakteri mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan pada medium TSA. Secara individu bakteri berbentuk batang.	
BE6	Koloni bakteri berbentuk bulat, tepi rata, halus mengkilat dan mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan pada medium TSA. Secara individu bakteri berbentuk batang.	

4.2 Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Kentang

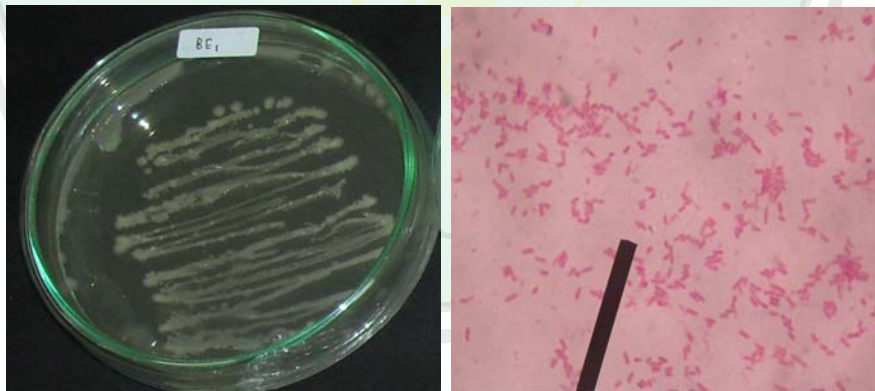
Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan, bakteri endofit yang telah berhasil diisolasi dari akar tanaman kentang didapatkan 3 isolat bakteri yaitu isolat bakteri dengan kode isolat BE1, BE5 dan BE6.

1. Isolat BE1

a. Ciri Makroskopis

Secara makroskopis koloni bakteri berbentuk bulat, tepi rata, permukaan halus mengkilap dan mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan sampai orange cerah pada medium TSA. Secara individu bakteri berbentuk batang. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C.

Koloni bakteri endofit dengan kode BE1, secara makroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.2 di bawah ini:



(a)

(b)

Gambar 4.2 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat BE1 pada Medium TSA, (b) Bentuk Sel *Pseudomonas pseudomallei* Secara Mikroskopik

b. Ciri Mikroskopis

Bakteri endofit diisolasi dari akar tanaman kentang yang diekstrak dan ditumbuhkan pada medium TSA. Bakteri endofit dengan kode isolat BE1 selnya berbentuk batang kecil, termasuk ke dalam golongan Gram negatif, dapat bergerak, umumnya berflagel polar tunggal dan mempunyai tipe metabolisme yang bersifat oksidatif (Buckle, K.A., dkk. 1985: 29), kemudian diuji dengan microbact GNB 12 A/12E dan GNB 12 B diperoleh hasil oksidase positif, motil, mereduksi nitrat, positif lysine, glukosa, gelatin, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, laktosa dan menghidrolisis raffinosa dan arginine. Menunjukkan hasil identifikasi dengan kode akses (oktal) 644004745 yang kemudian diinput dengan program file microbact bakteri dengan ciri-ciri tersebut tergolong dalam genus *Pseudomonas* dan spesies *Pseudomonas pseudomallei* dengan tingkat keakuratannya sebesar 98,94%.

c. Klasifikasi

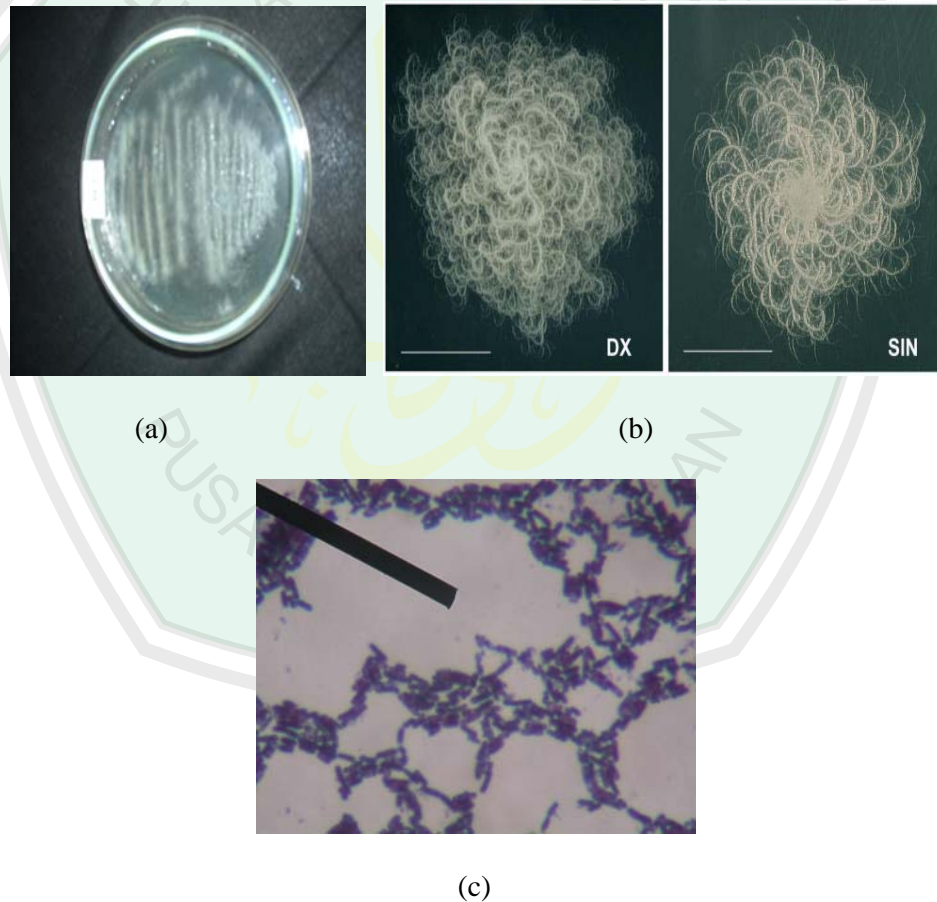
Kingdom : Bacteria
Filum : Proteobacteria
Klas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Pseudomonadales
Famili : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Spesies : *Pseudomonas pseudomallei* (Bergey's, 1995)

2. Isolat BE5

a. Ciri Makroskopis

Koloni bakteri berbentuk seperti benang (*filamentous*) dan mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan pada medium TSA. Secara individu bakteri berbentuk batang.

Koloni bakteri endofit dengan kode BE5, secara makroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat BE5 pada Medium TSA, (b) Bentuk Koloni *Bacillus mycooides* Secara Makroskopik dengan Perbesaran 1000 X (Franco, 2002: 1), (c) Bentuk Sel *Bacillus mycooides* Secara Mikroskopik

b. Ciri Mikroskopis

Bakteri endofit diisolasi dari akar tanaman kentang yang diekstrak dan ditumbuhkan pada medium TSA, kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, diperoleh hasil Gram positif. Isolat BE5 selnya berbentuk batang dan umumnya cukup besar (Buckle, K.A., dkk. 1985: 29), berukuran 3-4 μm , mempunyai ujung yang persegi dan tersusun dalam rantai panjang (Jawetz, 2001: 286), mempunyai spora dan sering bergerak dengan flagella *peritrichous* (Buckle, K.A., dkk. 1985: 29), kemudian diuji dengan uji konvensional, mengfermentasi gula-gula seperti glukosa, laktosa dan maltosa. Tumbuh pada medium Nutrient Broth. Bakteri ini bersifat motil. Suhu pertumbuhan untuk bakteri ini adalah antara 25°C – 40°C, resisten terhadap penisilin, positif membentuk Beta-Hemolisa, positif mengkatalase hidrogen tanpa oksidase, positif mereduksi nitrat dan mereduksi methylene. Bakteri dengan ciri-ciri tersebut menurut uji konvensional tergolong dalam genus *Bacillus* dan spesies *Bacillus mycoides*.

b. Klasifikasi

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Klas	: Bacili
Order	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus mycoides</i> (Bergey's, 1995)

3. Isolat BE6

a. Ciri Makroskopis

Koloni bakteri berbentuk bulat, tepi rata, permukaannya halus mengkilat dan mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan pada medium TSA. Secara individu bakteri berbentuk batang. Bakteri ini termasuk bakteri aerobik, tetapi juga dapat menjadi anaerobik fakultatif. Berdasarkan karakteristik optik bakteri ini termasuk *translucent* (dapat ditembus cahaya sebagian).

Koloni bakteri endofit dengan kode BE6, secara makroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.4 di bawah ini:



Gambar 4.4 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat BE6 pada Medium TSA, (b) Bentuk Sel *Klebsiella ozaenae* Secara Mikroskopik

b. Ciri Mikroskopis

Bakteri endofit diisolasi dari akar tanaman kentang yang diekstrak dan ditumbuhkan pada medium TSA. Bakteri endofit dengan kode isolat BE5 selnya berbentuk batang, termasuk ke dalam golongan Gram negatif, kemudian diuji dengan microbact GNB 12 A dan 12 E diperoleh hasil oksidasi negatif, non motil,

positif lysine, glukosa, mannitol, xylose, ONPG, citrate. Menunjukkan hasil identifikasi dengan kode fikasi (oktal) 4742 yang kemudian diinput dengan program file microbact bakteri dengan ciri-ciri tersebut tergolong dalam genus *Klebsiella* dan spesies *Klebsiella ozaenae* dengan tingkat keakuratannya sebesar 94,13%. Suhu pertumbuhan untuk bakteri ini adalah 37°C.

c. Klasifikasi

Kingdom : Bacteria
 Filum : Protobacteria
 Klas : Gamma Proteobacteria
 Order : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : *Klebsiella*
 Spesies : *Klebsiella ozaenae* (Bergey's, 1995)

4.3 Uji Kemampuan Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Kentang Terhadap Rata-Rata Kematian Larva Nematoda *G. rostochiensis*.

4.3.1 Pengaruh Waktu Perlakuan Terhadap Rata-Rata Kematian Larva Nematoda *G. rostochiensis*

Berdasarkan hasil analisis variansi (ANOVA) menunjukkan bahwa $F_{hitung} < F_{tabel}$ 0,05, yang berarti hal ini menunjukkan bahwa waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) tidak memberikan pengaruh terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis* karena tidak menunjukkan perbedaan jumlah kematian larva nematoda *G. rostochiensis*. Data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1 tabel 3.

Pada penelitian ini proses penghambatan terhadap pertumbuhan larva nematoda *G. rostochiensis* adalah dengan memanfaatkan enzim kitinase yang dihasilkan pada fase eksponensial. Waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) 2, 4, dan 6 hari ketiga antagonis (*B. mycoides*, *Ps. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) dimungkinkan sudah berada pada fase stasioner (fase tetap). Hal inilah yang menyebabkan waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) tidak memberikan pengaruh terhadap jumlah kematian larva nematoda *G. rostochiensis*.

Umumnya, semakin lama waktu inkubasi maka akan menyebabkan semakin tinggi pula tingkat kematian larva nematoda *G. rostochiensis*. Dari hasil analisis variansi (ANOVA), diketahui bahwa waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) tidak memberikan pengaruh terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*. Lama waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) berkaitan dengan waktu pertumbuhan optimum untuk masing-masing bakteri yang mempunyai waktu pertumbuhan optimum yang berbeda-beda untuk masing-masing spesies. Kelompok bakteri Pseudomonaceae, Enterobacteriaceae dan Bacillaceae merupakan kelompok bakteri yang mempunyai kecepatan tumbuh tinggi (Buckle, K.A., dkk. 1985: 31).

Isolat *Bacillus* sp yang ditumbuhkan pada medium SMSSe (*Stone Mineral Salt Solution* yang mengandung 0,01% ekstrak ragi) yang diisolasi dari minyak bumi dari sumur bangko pada temperatur 50°C baru mengalami fase eksponensial yang nyata mulai jam ke 12 dan mencapai jumlah sel maksimum yaitu pada jam ke 24, sedangkan untuk *Bacillus licheniformis* pada jam ke 24 masih berada pada fase adaptasi. Isolat *Pseudomonas aeruginosa* mengalami fase

eksponensial pada jam ke 36 (Aditiawati, dkk. 2001: 2). *B. mycoides* yang masih berada dalam satu genus dengan *B. licheniformis*, waktu yang dibutuhkan untuk dapat mencapai fase eksponensial dimungkinkan juga terjadi pada kisaran jam ke 24. *Ps. pseudomallei* yang juga masih berada dalam satu genus dengan *Ps. aeruginosa*, dimungkinkan waktu yang dibutuhkan untuk dapat mencapai fase eksponensial juga terjadi pada kisaran jam ke 36. Hal ini membuktikan bahwa masing-masing kelompok bakteri mempunyai waktu yang berbeda-beda untuk dapat mencapai fase eksponensial. Pada fase eksponensial ini bakteri sudah mencapai pertumbuhan optimum, dimana terjadi pembelahan sel dengan laju yang konstan dengan massa yang membelah menjadi dua kali lipat.

Proses penghambatan terhadap pertumbuhan larva nematoda *G. rostochiensis* adalah dengan memanfaatkan enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri endofit dari ketiga antagonis (*B. mycoides*, *Ps. pseudomallei* dan *K. ozaenae*). Enzim merupakan hasil dari 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 (Anonymous, 2008: 354).

Setelah bakteri berada pada fase logaritma (eksponensial), maka selanjutnya bakteri ini akan memasuki fase stasioner (fase tetap), yang mana pada fase ini bakteri jarang dapat tetap tumbuh secara eksponensial dengan kecepatan tinggi (Buckle, 1985: 40). Enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang dimanfaatkan dalam proses penghambatan larva nematoda *G. rostochiensis* dihasilkan pada fase eksponensial dari fase pertumbuhan bakteri. Pada fase ini

aktivitas enzim kitinase bekerja secara optimum. Waktu pengamatan 2, 4, dan 6 hari ketiga antagonis (*B. mycooides*, *Ps. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) dimungkinkan sudah berada pada fase stasioner (fase tetap).

Hal ini juga dibuktikan dalam penelitian (Yuliar, 2008: 85), bahwa kelompok *Bacillus* sp pada hari ke 2 pH sudah mengalami kenaikan dari 6 menjadi lebih dari 8 pada hari ke 7 masa inkubasi. Kenaikan pH ini karena isolat menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder dihasilkan pada fase stasioner. Pada fase stasioner (fase tetap) ini aktivitas enzim kitinase sudah mengalami penurunan karena bakteri ini tidak tetap tumbuh secara eksponensial dengan kecepatan tinggi.

Selain itu kemampuan bakteri dalam menekan pertumbuhan nematoda *G. rostochiensis* juga dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suplai zat gizi (nutrisi), waktu, suhu, nilai pH dan aktivitas air. Hal inilah yang menyebabkan waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) tidak berpengaruh terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*.

4.3.2 Pengaruh Pemberian Bakteri Endofit Terhadap Rata-Rata Kematian Larva

Nematoda *G. rostochiensis*

Berdasarkan hasil analisis variansi (ANAVA) menunjukkan bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ 0,05, yang berarti hal ini menunjukkan terdapat pengaruh pemberian bakteri endofit terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*. Data hasil pengamatan dengan kematian larva nematoda *G. rostochiensis* selengkapnya dicantumkan pada lampiran 1. Selanjutnya hasil uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5% disajikan pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Pengaruh Pemberian Bakteri Endofit Terhadap Rata-Rata Kematian Larva Nematoda *G. rostochiensis*

Perlakuan Bakteri	Rata-Rata Kematian Larva Nematoda <i>G. rostochiensis</i>
B0 (kontrol)	5,23 a
B1 (<i>K. ozaenae</i>)	7,56 b
B3 (<i>Ps. pseudomallei</i>)	8,73 bc
B2 (<i>B. mycooides</i>)	9,28 c

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%

Berdasarkan uji lanjut dengan DMRT 5% pada tabel 4.3 menunjukkan bahwa perlakuan B0 (kontrol) memberikan nilai terendah, hal ini dikarenakan pada perlakuan B0 adalah merupakan kontrol yang pada perlakuannya tidak ada penambahan suspensi bakteri endofit. Berdasarkan tabel 4.3, diketahui bahwa perlakuan B0 memiliki nilai 5,23, yang artinya pada perlakuan kontrol terdapat larva nematoda *G. rostochiensis* yang mati. Kematian larva nematoda *G. rostochiensis* di dalam sista pada perlakuan kontrol disebabkan oleh banyak faktor, diantaranya adalah faktor lingkungan abiotis. Faktor lingkungan abiotis yang paling berpengaruh terhadap penetasan telur nematoda *G. rostochiensis* adalah suhu (Hadisoeganda, 2006: 226). Perbedaan suhu antara habitat asli tanaman inang nematoda *G. rostochiensis* dengan suhu pada kondisi laboratorium inilah yang dimungkinkan menyebabkan terjadinya kematian larva nematoda *G. rostochiensis* di dalam sista, meskipun kondisi suhu sudah diperlakukan sama. Faktor lain yang dimungkinkan menyebabkan kematian larva nematoda *G. rostochiensis* di dalam sista adalah pada saat pengambilan sampel sista, telur sudah mengalami penetasan. Hal ini disebabkan karena adanya rangsangan dari eksudat akar kentang.

Perlakuan B2 (*B. mycoides*), B3 (*Ps. pseudomallei*) dan B1 (*K. ozaenae*) memberikan nilai terbaik, masing-masing memiliki nilai rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis* yaitu 9,28; 8,73 dan 7,56.

Dari hasil analisis di atas, dapat diketahui bahwa bakteri endofit yang lebih efektif dalam menekan pertumbuhan larva nematoda *G. rostochiensis* adalah *B. mycoides*. Hal ini membenarkan pernyataan yang diungkapkan oleh Cook dan Baker (1983) dalam Djatmiko (2007: 41) bahwa *Bacillus* spp. merupakan salah satu agensia pengendali hayati yang mempunyai kemampuan yang baik dalam pengendalian patogen lewat tanah.

Endospora (spora yang dihasilkan di dalam sel) yang dibentuk oleh Genus *Bacillus* bersifat Dorman (suatu keadaan sel yang tidak aktif dan proses metabolisme berkurang). *Bacillus* resisten terhadap panas (suhu lebih dari 80°C) dan tahan terhadap radiasi gelombang pendek. Ketahanan terhadap suhu tinggi karena *Bacillus* mampu membentuk spora (endospora) (Madigan, dkk., 1997; Breithaupt, 2001 dalam Tika, dkk., 2007: 111). Spora pada *Bacillus* bukan merupakan alat perkembangbiakan, tetapi merupakan usaha bakteri untuk melindungi diri dari keadaan yang kurang menguntungkan (kondisi ekstrem) (Siregar, 2008: 32).

Kemampuan antagonis dalam menekan patogen secara *in vitro* karena pada kondisi laboratorium, antagonis hanya berhadapan dengan patogen dan ada dalam lingkungan yang kaya nutrisi, sehingga mampu memunculkan kemampuannya dalam menghambat patogen.

Kemampuan tersebut karena ketiga antagonis (*B. mycoides*, *Ps. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) mampu menghasilkan enzim kitinase (Yurnaliza, 2002: 7). Banyak organisme seperti bakteri, jamur, tumbuhan tingkat tinggi, dan hewan menghasilkan kitinase yang mengkonversi kitin menjadi monomer atau oligomernya. Organisme ini biasanya memiliki beragam gen kitinase yang ekspresinya diinduksi oleh ekstraseluler kitin atau derivatnya. Bakteri memanfaatkan kitinase untuk asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Enzim ini digunakan sebagai pertahanan melawan serangan organisme patogen yang mengandung kitin (Guswenrivo, 2008: 21).

Enzim kitinase yang dihasilkan oleh ketiga antagonis (*B. mycoides*, *Ps. pseudomallei* dan *K. ozaenae*) dimanfaatkan untuk melakukan penetrasi kutikula sista *G. rostochiensis* dan menghidrolisis telur nematoda *G. rostochiensis* yang sebagian besar penyusunnya adalah zat kitin. 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: 11). Kemudian enzim kitinase akan menghidrolisis kulit telur nematoda yang sebagian besar penyusunnya adalah kitin (Indarti, 2008: 1). Selanjutnya perkembangbiakan nematoda menjadi terhambat dan akhirnya akan mati (Mustika, 2006: 11).

Antagonis *Pseudomonas* spp. dan *Bacillus* spp. mempunyai pengaruh langsung pada telur dan mobilitas nematoda (Kerry, 2000 dalam Djatmiko, 2007: 45) dan kemampuan menekan nematoda dengan memproduksi metabolit yang

mengurangi aktivitas nematoda (Siddiqui dan Shaukat, 2002 dalam Djatmiko, 2007: 45).

4.3.3 Pengaruh Interaksi Perlakuan Terhadap Rata-Rata Kematian Larva Nematoda *G. rostochiensis*

Berdasarkan hasil analisis variansi (ANOVA) menunjukkan bahwa $F_{hitung} < F_{tabel}$ 0,05, yang berarti hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh interaksi dari perlakuan terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*. Data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1 tabel 3.

Lama waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*, maka hal inilah yang menyebabkan interaksi antara waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) dengan spesies bakteri endofit tidak memberikan pengaruh terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*. Artinya, spesies bakteri endofit tidak melakukan interaksi terhadap lama waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) yang mampu menekan pertumbuhan larva nematoda *G. rostochiensis*. Jadi, antara spesies bakteri endofit dan lama waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) bekerja sendiri-sendiri dalam menekan pertumbuhan larva nematoda *G. rostochiensis*. Namun, dalam hal ini yang mempunyai peran penting dalam menekan pertumbuhan larva nematoda *G. rostochiensis* adalah spesies dari bakteri endofit, karena berdasarkan dari hasil analisis variansi diketahui bahwa lama waktu pengamatan (lama waktu inkubasi) tidak memberikan pengaruh terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*.