

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI UMBI
TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) MENGGUNAKAN
PRIMER PCR-RAPD**

SKRIPSI

Oleh :

AAN ROSITA

NIM. 08620016



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)

MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

2012

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI UMBI
TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) MENGGUNAKAN
PRIMER PCR-RAPD**

SKRIPSI

**Diajukan kepada :
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh :
AAN ROSITA
NIM. 08620016**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2012**

LEMBAR PERSETUJUAN
ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI UMBI
TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) MENGGUNAKAN
PRIMER PCR-RAPD

SKRIPSI

Oleh :
AAN ROSITA
NIM. 08620016

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal.....8 September 2012

Pembimbing I



Ir. Lilik Hariani, M.P.

NIP. 19620901 199803 2 001

Pembimbing II

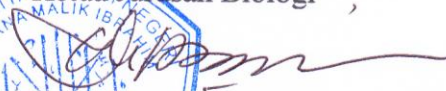


Moch. Imammudin, M.A.

NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui :

Ketua Jurusan Biologi ,



Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd
NIP. 19630114 199903 1 001

LEMBAR PENGESAHAN
ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI UMBI
TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) MENGGUNAKAN
PRIMER PCR-RAPD

SKRIPSI

Oleh :

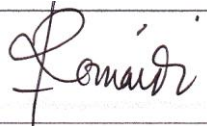
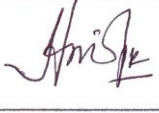
AAN ROSITA

NIM. 08620016

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 15 September 2012

Susunan Dewan Penguji :

Tanda Tangan

Penguji Utama :	Romaidi, M.Si NIP. 19810201 200901 1 019	
Ketua Penguji :	Dr. Drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si NIP. 19710919 200003 2 001	
Sekretaris Penguji:	Ir. Lilik Haranie, M. P NIP. 19620901 199803 2 001	
Anggota Penguji :	Moch. Imammudin, M.A NIP. 19740602 200901 1 010	

Mengetahui :

Ketua Jurusan Biologi ,



Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd
NIP. 19630114 199903 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Aan Rosita

NIM : 08620016

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 15 September 2012

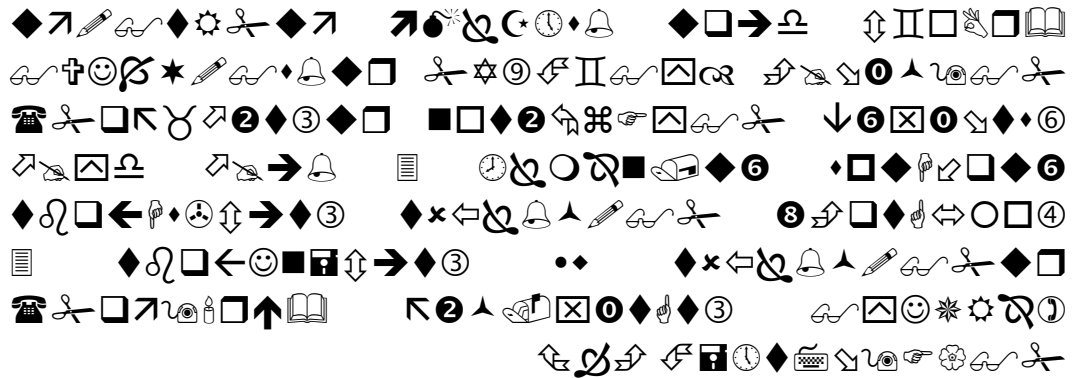
Yang Membuat Pernyataan

Materai

Aan Rosita

NIM. 08620016

Motto



Artinya; (apakah kamu Hai orang musyrik yang lebih beruntung) ataukah orang yang beribadat di waktu-waktu malam dengan sujud dan berdiri, sedang ia takut kepada (azab) akhirat dan mengharapkan rahmat Tuhannya? Katakanlah: "Adakah sama orang-orang yang mengetahui dengan orang-orang yang tidak mengetahui?" Sesungguhnya orang yang berakallah yang dapat menerima pelajaran.

PERSEMBAHAN

Ku Persembahkan Karya Tulis Ini
 Yang Pertama Dan Terutama Pada:
 Ayahanda Djadiono Dan Ibunda Khanifah Tercinta Yang
 Telah Memberikan Segala Kasih Sayang, Do'a Dan Segalanya
 Yang Tak Mungkin Dapat Ku Balas Iasanya.....
 Adik Ku Dwi Anggraini Yang Selalu Memotivasi Dan Memberikan
 Do'anya.....

Semua Guru-Guruku Saat Masa-Masa Sekolah,
 Atas Jasa Kalian, Sehingga Aku Tahu Betapa Mulyanya Ilmu
 Itu....

All My Friends (Yulida, Izma, Lian, Aini, Yuli, Maufida, Tiwi,
 Sheila, Zulfa, Ashif, Rini, Fida, dll) Kalian Keceriaan Dan
 Ketenangan Ku....
 Tanpa Kalian Tak Ada Yang Mewarnai Hari-Hari Ku.....
 Your All The Best In My Life.....

Serta Orang-Orang Yang Selalu Mencintaiku
 Walau Aku Tak Dapat Membalas Sepenuhnya
 Semoga Allah Yang Selalu Melimpahkan Cinta Untuk Semua

Amin... Amin Ya Rebal Aamin

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas rahmat, taufiq, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Menggunakan Primer PCR-RAPD”. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang akan memberi syafaat kepada umatnya yang taat.

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini tidak akan terlepas dari bimbingan, dukungan, dan bantuan dari semua pihak sehingga terselesaikannya skripsi ini. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- 1 Prof. Dr. Imam Suprayogo, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, yang memberikan dukungan serta kewenangan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
- 2 Prof. Drs. Sutiman Bambang Sumitro, S.U,DSc, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 3 Dr. Eko Budi Minarno, M. Pd selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

- 4 Ir. Lilik Haranie, M. P selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis, sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
- 5 Moch. Imammudin, M.A selaku Dosen Pembimbing Agama yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
- 6 Para Dosen / Staf Pengajar di lingkungan UIN Maliki Malang.
- 7 Kedua orang tuaku yang selalu memberikan doa, semangat, motivasi serta nasehat-nasehat dengan penuh keikhlasan, kesabaran serta kasih sayang yang tiada tara sehingga penulis bisa mengenyam pendidikan setinggi ini.
- 8 Adikku, teman-temanku seperjuangan yang telah memberikan doa, motivasi, kasih sayang serta semangat yang tiada hentinya sehingga terselesaikannya skripsi ini.
- 9 Seluruh keluargaku terima kasih atas doa, motivasi dan jasa-jasanya.
- 10 Teman-temanku Biologi angkatan 2008 terima kasih untuk semua persahabatan dan kekompakannya.

Sebagai ungkapan terima kasih, penulis hanya mampu berdoa semoga bantuan yang telah diberikan kepada penulis diterima disisi-Nya serta mendapat imbalan yang setimpal.

Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca pada umumnya dan bagi penulis khususnya.

Malang, 2 September 2012

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
MOTTO.....	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	.vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK.....	xv

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.5 Batasan Masalah.....	7

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	8
2.1.1 Morfologi Tanaman Kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	8
2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	11
2.1.3 Umbi Tanaman Kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	11
2.2 Bakteri Endofit.....	13
2.2.1 Jenis-Jenis Bakteri Endofit.....	17
2.3 16S rDNA.....	19
2.4 Identifikasi Mikroorganisme Menggunakan 16S rDNA.....	21
2.5 Teknik PCR (Polymerase Chain Reaction).....	22
2.5.1 Denaturasi.....	22
2.5.2 Penempelan Primer pada Cetakan DNA (annealing).....	23
2.5.3 Pemanjangan Primer.....	23
2.6 Teknik PCR (Polymerase Chain Reaction)-RAPD.....	26

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.2 Instrumen Penelitian.....	29
3.2.1 Alat.....	29
3.2.2 Bahan.....	29
3.3 Kegiatan Penelitian.....	30
3.3.1 Sterilisasi Alat.....	30
3.3.2 Isolasi Bakteri Endofit.....	30
3.3.3 Pembuatan Media YPDA (Yest Potato Dextrose Agar).....	30
3.3.4 Kultur Bakteri Endofit.....	31
3.3.5 Isolasi DNA Genom dari Bakteri Endofit Secara Konvensional.....	31
3.3.6 Amplifikasi Menggunakan PCR.....	34
3.3.7 Elektroforesis Gel Agarosa.....	35
3.3.8 Analisis Data.....	35

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Isolasi Bakteri Endofit.....	37
4.1.1 Isolat U1 (Umbi 1).....	39
4.1.2 Isolat U2 (Umbi 2).....	40
4.1.3 Isolat U3 (Umbi 3).....	40
4.1.4 Isolat U4 (Umbi 4).....	41
4.1.5 Isolat U5 (Umbi 5).....	42
4.1.6 Isolat U6 (Umbi 6).....	43
4.2 Hasil PCR-RAPD.....	45

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran.....	53

DAFTAR PUSTAKA.....	54
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	61
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

4.1 Morfologi Koloni dan Pewarnaan Gram dari Isolat Bakteri Endofit	37
4.2 Tabel Jumlah dan Ukuran Fragmen DNA bakteri endofit.....	49

DAFTAR GAMBAR

2.1 Morfologi Tanaman Kentang, a. Tanaman kentang, b. Buah kentang, c. Bunga kentang, d. Umbi kentang.....	10
2.2 Gambar Pertunasan Tanaman kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	10
2.3 Gambar Anatomi Umbi Tanaman kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.)....	12
4.1 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U1 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik.....	39
4.2 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U2 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik.....	40
4.3 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U3 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik.....	41
4.4 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U4 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik.....	41
4.5 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U5 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik.....	42
4.6 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U6 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik.....	43
4.7 DNA Genom pada Hasil Elektroforesis, Kontrol, U1, U2, U3, U4, U5, U6.....	46
4.8 Elektroforesis Hasil PCR (sesudah PCR Primer Khusus) Marker, U1, U2, U3, U4, U5, U6, Kontrol.....	48

DAFTAR LAMPIRAN

1.	Lampiran 1.....	61
2.	Lampiran 2.....	66

ABSTRAK

Rosita, Aan. 2012. **Isolasi dan Karakteristik Bakteri Endofit dari Umbi Tanaman Kentang** (*Solanum tuberosum*. L) *Menggunakan Primer PCR-RAPD*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I) Ir. Liliek Hariani, AR. M.P, (II) Mohammad Imammuddin, M.A

Kata Kunci : bakteri endofit, primer umum dan primer khusus, Pola pita PCR-RAPD

Bakteri yang berasosiasi dengan tanaman dan hidup pada jaringan tanpa menimbulkan ancaman bagi tumbuhan didefinisikan sebagai bakteri endofit. Sejumlah penelitian telah dilakukan terhadap bakteri endofit pada tanaman kentang (*Solanum tuberosum*) untuk mengetahui potensi bakteri endofit sebagai agen pengendali hayati terhadap penyakit yang menyerang tanaman kentang. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil isolasi bakteri endofit pada umbi tanaman kentang, serta mengetahui karakteristik molekuler bakteri endofit berdasarkan pola pita DNA dari teknik PCR-RAPD.

Penelitian ini dilaksanakan tanggal 8 Januari 2012 sampai 27 Juli 2012 yang bertempat di Laboratorium Biomolekuler dan Genetika Universitas Islam Negeri Malang. Metode yang digunakan adalah deskriptif eksploratif. Dimana sampel bakteri endofit yang ditumbuhkan pada media YPDA (Yest Potato Dextrose Agar), di isolasi DNANYA untuk dianalisis dengan teknik PCR-RAPD. Parameter yang dilihat dari penelitian ini tidak hanya dari morfologi koloni bakteri, cat gram, dan hasil kultur, namun juga pada pola pita DNA bakteri endofit dari hasil PCR-RAPD.

Hasil isolasi bakteri endofit dari umbi tanaman kentang diperoleh 6 isolat bakteri endofit. Keenam isolat bakteri endofit tersebut mempunyai karakter yang bervariasi, yakni bentuk koloni isolat yang didominasi oleh Irregular (bulat tidak rata). Elevasi koloni terdiri 2 yakni Umbonate (cembung tambahan) dan convex (cembung). Sedangkan, pewarnaan gram sel bakteri diperoleh isolat bersifat gram negatif dengan bentuk koloni didominasi oleh bacillus. Berdasarkan karakteristik molekuler bakteri endofit yang dilihat dari pola pita DNA hasil PCR-RAPD, menunjukkan panjang basa yang berbeda. Seperti pada penggunaan primer khusus, pola pita DNA bakteri endofit berkisar antara 1000bp-1200bp. Pada penggunaan primer umum, pola pita DNA bakteri endofit berkisar antara 800bp. Perbedaan yang terdapat pada pola pita kedua primer tersebut adalah, munculnya beberapa pita pada U1 saat menggunakan primer khusus. Sedangkan pada primer umum hanya 1 pita DNA saja. Begitu pula pada U5 dan U6, yang muncul doubleband dengan panjang basa yang sama. Namun pada penggunaan primer umum tidak muncul.

ABSTRACT

Rosita, Aan. 2012 **Isolation and Characteristics of Endophytic Bacteria Tuber Crop Potato** (*Solanum tuberosum*. L) *Using PCR-RAPD Primer*. Theses. Biology Programme Faculty of Science and Technology, The State of Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang.

Promotor: (I) Ir. Liliek Hariani, AR. M.P
(II) Mohammad Imammuddin, M.A

Bacteria associated with plants and live on the network without causing a threat to the plant is defined as endophytic bacteria. Numerous research have been conducted on endophytic bacteria on potato (*Solanum tuberosum*) to determine the potential of endophytic bacteria as biological control agents against a disease that attacks potato plants. Purpose of this study was to determine the isolated endophytic bacteria on potato tubers, and to know the molecular characteristics of endophytic bacteria based on DNA banding pattern of PCR-RAPD technic.

This study implemented dated January 8, 2012 until July 27, 2012 held at the Laboratory of Biomolecular and Genetics of the State Islamic University of Malang. The method used is descriptive exploratory. Where samples of endophytic bacteria grown on media YPDA (Yest Potato Dextrose Agar), DNA was isolated for analized by PCR-RAPD. Parameters are seen from this study not only from the morphology of bacterial colonies, gram paint, and the results of culture, but also the DNA banding pattern of endophytic bacteria from the PCR-RAPD.

The isolated of endophytic bacteria from potato tubers obtained six isolates of endophytic bacteria. The six isolates of the endophytic bacteria have variated characters, which form colonies of isolates were dominated by irregular. Elevation of the colony consists 2 Umbonate (additional convex) and convex. Meanwhile, gram staining of bacteria cells are gram-negative isolates obtained form colonies dominated by bacillus. Based on the molecular characteristics of endophytic bacteria DNA band pattern of RAPD-PCR results, indicating the length of different bases. As in the use of specific primers, DNA banding pattern of endophytic bacteria ranged from 1000bp-1200bp. On the use of general primers, DNA banding pattern of endophytic bacteria ranged from 800B. The differences were found in both primers banding pattern is, the emergence of several bands on the U1 when using specific primers. While in general primers only one DNA bands only. Similarly, the U5 and U6, which appears dobleband with the same basa length. However, the use oo general primers is not appears.

Key words: bacterial endophyte, general primers and specific primers, PCR-RAPD pattern ribbon

الملخص

البطاطا درنات الداخلي النابت الـ بكتيريـا وخصائص الـ عزلة. Rosita, Aan. 2012.
مؤدب. الـ تمهـ يدي PCR-RAPD الـ سد تخدام (Solanum tuberosum. L) اـ صـ يلـ المـ
Mohammad; والـ دين الـ مـ علمـ دمـج الـ شـراف Ir. Liliek Hariani, AR. M.
Imammuddin, M.A

و شاح والـ خاصة، الـ عامة الـ ادب تـدائـ يـة الـ شعـال داخـلي، نـابـوت الـ بكتـيريـة: الـ بـحث كـلمات
PCR-RAPD نمط

يتم تعريف البكتيريا المرتبطة النباتات ويعيشون على الشبكة دون أن تسبب خطرا على النبات والبكتيريا النابت الداخلي وقد أجريت العديد من الدراسات على البكتيريا النابت الداخلي على البطاطس لمعرفة البكتيريا النابت الداخلي وكيل مكافحة البيولوجية المحتملة ضد هذا المرض الذي يهاجم نباتات البطاطا وكان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد البكتيريا المعزولة النابت الداخلي على درنات البطاطا، ومعرفة DNA PCR-RAPD الخصائص الجزيئية للبكتيريا النابت الداخلي يعتمد على نمط من النطاقات

عقد 2012 هل كانت هذه الدراسة التي أجريت في 8 يناير 2012 وحتى 27 يوليو، في مختبر علم الوراثة الجزيئية البيولوجية ومن الجامعة الإسلامية مالانج. الطريقة المستخدمة هي استكشافية وصفية. حيث عينات البكتيريا النابت الداخلي نمت على وسائل الإعلام YPDA تم عزل الحمض النووي لتحليلها من قبل PCR-RAPD وينظر المعلومات من هذه الدراسة ليس فقط من التشكل مستعمرة بكتيرية، والطلاء غرام، والنتائج والثقافة، ولكن أيضا على الحمض النووي البكتيريا النابت الداخلي النطاقات نمط PCR-RAPD النتائج.

الحصول على البكتيريا المعزولة من النابت الداخلي درنات البطاطا 6 عزلات من البكتيريا النابت الداخلي. العزلات ستة من البكتيريا النابت الداخلي متفاوتة سيطر الأحرف، والتي تشكل مستعمرات غير منتظمة من العزلات (الجولة يست مسطحة. (ارتفاع مستعمرة تتكون 2 أبجر) محدبة إضافية (ومحدبة) محدبة. وفي الوقت نفسه، الخلايا البكتيرية تلتطيخ غرام هي سالبة الجرام المعزولة التي تم الحصول عليها المستعمرات التي يسيطر عليها شكل عصية. بناء على الخصائص الجزيئية للبكتيريا النابت الداخلي DNA نمط عصابة من PCR-RAPD النتائج، والتي تبين أسس مختلفة طويلة. كما هو الحال في استخدام بادئات محددة، تراوحت DNA النطاقات نمط من البكتيريا النابت الداخلي من 1000-bp1200 بشكل عام استخدام الأولية، وأنماط من العصابات DNA تتراوح بين 800 bp. البكتيريا النابت الداخلي. تم العثور على اختلافات في كل من النمط الأساسي والنطاقات، وظهور عصابات على عدة U1 عند استخدام بادئات محددة. بينما في عام واحد فقط العصابات DNA الأولية فقط. وبالمثل، فإن U5 U6، الذي يظهر دوبلي الفرقة مع طول نفس القاعدة. ومع ذلك، فإن استخدام الاشعال العامة لا تظهر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan tanaman semusim yang berbentuk semak, termasuk *Divisi Spermatophyta*, *Subdivisi Angiospermae*, *Kelas Dicotyledonae*, *Ordo Tubiflorae*, *Famili Solanaceae*, *Genus Solanum*, dan *Spesies Solanum tuberosum* L. (Beukema, 1977).

Tanaman kentang berasal dari Amerika Selatan (Peru, Chili, Bolivia, dan Argentina) serta beberapa daerah Amerika Tengah. Di Eropa tanaman itu diperkirakan pertama kali diintroduksi dari Peru dan Colombia melalui Spanyol pada tahun 1570 dan di Inggris pada tahun 1590 (Hawkes, 1990). Penyebaran kentang ke Asia (India, Cina, dan Jepang), sebagian ke Afrika, dan kepulauan Hindia Barat dilakukan oleh orang-orang Inggris pada akhir abad ke-17 dan di daerah-daerah tersebut kentang ditanam secara luas pada pertengahan abad ke-18 (Hawkes, 1992).

Kentang merupakan bahan pangan dari umbi tanaman perennial *Solanum tuberosum* L. dari *Family Solanaceae*. Kentang juga salah satu pangan utama dunia setelah padi, gandum dan juga jagung yang mendapatkan prioritas dalam pengembangannya di Indonesia (Wattimena, 2000; Suwarno, 2008).

Berdasarkan volumenya kentang merupakan bahan pangan keempat di dunia setelah padi, jagung, dan gandum. Kentang hanya dapat hidup di daerah dataran tinggi sekitar 1000-3000 meter di atas permukaan laut. Sentra produksi

kentang di Indonesia tersebar di daerah Sumatera Utara, Sumatera Barat, Jambi, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan (Beukema, 1977).

Kentang merupakan salah satu jenis tanaman umbi yang dapat memproduksi makanan bergizi lebih banyak dan lebih cepat, namun membutuhkan hamparan lahan lebih sedikit dibandingkan dengan tanaman lainnya. Pada basis bobot segar, kentang memiliki kandungan protein tertinggi dibandingkan dengan umbi-umbian lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa kentang memiliki potensi dan prospek yang baik untuk mendukung program diversifikasi dalam pangan dalam rangka mewujudkan ketahanan pangan berkelanjutan (Departemen Perlindungan Tanaman, 2008).

Kendala utama dalam pembudidayaan tanaman kentang adalah serangan hama dan penyakit. Salah satu contoh hama tanaman kentang adalah *Globodera rostochiensis*. Di Chili, Italia dan Polandia telah terjadi penurunan tingkat produksi atau hasil panen budidaya kentang hingga lebih dari 70% karena serangan nematoda *G. rostochinensis* (Lisnawati, 2003).

Menurut Ditlin (2008) dalam Juwita (2010) di Indonesia serangan hama yang sama juga terjadi di kota Batu, Malang, Jawa Timur, yang dilaporkan bahwa terjadi serangan nematoda *G. rostochiensis* pada tanaman kentang. sekitar 25% total lahan diserang oleh nematoda *G. restochiensis*.

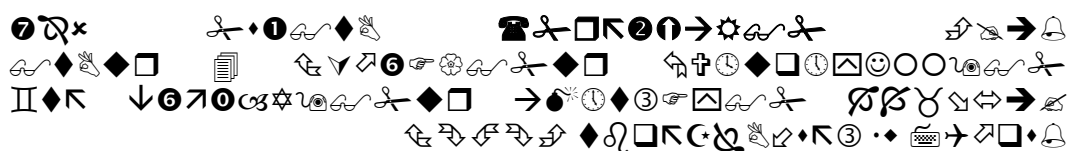
Pengendalian biologi dengan menggunakan bakteri endofit merupakan salah satu alternative pengendalian nematoda parasit tanaman. Keunggulan bakteri endofit sebagai agen pengendali hayati yang mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi, menghasilkan hormone pertumbuhan dan mengendalikan penyakit

tumbuhan (Klopper, 1992; Harni, 2006). Sedangkan menurut Harni (2006) mengatakan bakteri endofit juga dapat digunakan dalam menginduksi ketahanan tanaman.

Mikroorganisme endofit merupakan mikroorganisme yang berasosiasi dengan jaringan atau sel tanaman tingkat tinggi dan tidak memberikan kerugian pada tanaman tersebut. Bakteri endofit dapat diisolasi dari permukaan benih, akar batang daun dan biji yang telah steril (Tarabily at al, 2003; Gustin 2009).

Pada tahun 2003, Long dkk telah melakukan isolasi bakteri endofit dari akar *Solanum sp.* dan melakukan uji aktivitas anti bakteri patogen pada tanaman. Penelitian tersebut menghasilkan 73 isolat bakteri endofit dengan 15 group fenotip yang memiliki potesi untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen tanaman. Penelitian yang dilakukan tersebut belum sampai pada determinasi spesies.

Alam ini sesungguhnya adalah laboratorium yang besar yang digelar Allah untuk penelitian, berupa tafakur mengenal sunatullah yaitu tentang fenomena alam. Yang dapat kita contohkan bahwa sebelum ilmuwan memulai suatu proyek baru, mereka biasanya mencari model pada makhluk hidup, dan meniru sistem dan disain makhluk hidup tersebut (As-Shiddieqy, 2000). Dengan kata lain, ilmuwan mengamati dan mempelajari rancangan-rancangan yang diciptakan oleh Allah di alam, setelah terilhami olehnya, merka pun lalu mengembangkan teknologi baru. Sebagaimana yang difirmankan Allah pada Q.S. Yunus :101.



Manusia disuruh mengamati alam sekitar, agar pengamatan tersebut menjadikan kita semakin mengenal Maha Besar Allah dan semakin membutuhkan Allah. Ini sesuai dengan ayat pertama yang turun kepada Nabi, yaitu kita disuruh *iqro'* pada sunatullah di alam ini, yaitu membaca dan menulis, sebagaimana difirmankan Allah pada Q.S. Al-'Alaq; 1.



Artinya: Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu yang Menciptakan, (Q.S. Al-
'Alaq; 1).

Ayat di atas menjelaskan bahwa kekayaan alam ini diperuntukkan bagi manusia dengan penuh makna yaitu agar manusia dapat menikmati dan memanfaatkan kekayaan alam. Dengan membaca hasil karya atau penelitian terdahulu, maka jalan keluar dari permasalahan atau pemanfaatan kekayaan alam dapat terpecahkan. Sesungguhnya memanfaatkan kekayaan alam demi mendapatkan hasil yang baik kedepannya, merupakan tujuan yang mulia. Namun, dalam memanfaatkan kekayaan alam harus secara bijaksana dengan mempertahankan kaedah-kaedah konservasi.

Identifikasi bakteri endofit dengan melihat karakteristik molekulernya ini dilakukan untuk mendapatkan data identifikasi yang lebih akurat. Karena adanya penggunaan primer spesifik. Selain itu dengan PCR-RAPD yang menggunakan primer 16S rDNA ini memudahkan dalam penggunaan selanjutnya, jika akan

dilihat sikuennya. Maka dalam penggunaan primer ini sangat menentukan, mana primer yang lebih cocok menunjukkan keakuratan hasilnya.

Aplikasi teknik molekuler untuk menganalisis keragaman mikroba, seperti analisis gen 16S-rDNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mampu menampilkan keragaman genetika mikroba, baik yang dapat dikulturkan maupun tidak. Gen 16S-rDNA merupakan pilihan karena gen ini terdapat pada semua prokariota dan memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya yang sangat bervariasi (Madigan et al. 2006). Penggunaan gen 16S rDNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekular yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies (Woese et al. 1990 dalam Khaeruni 2005). Analisis keragaman genetika yang cepat dan sederhana, untuk menelaah profil DNA gen 16S-rDNA hasil amplifikasi dengan PCR dapat dilakukan dengan teknik *Siquensing*. Analisis ini dilakukan dengan cara mengamplifikasi gen 16S-rDNA dengan primer yang disesuaikan dengan sampel DNA yang akan diamplifikasi Marchesi et al. (1998) dan Lane (1991) telah mendesain primer untuk amplifikasi gen 16S-rDNA yang memungkinkan untuk melakukan studi keragaman bakteri secara genetik.

Selain itu keunggulan dari identifikasi dengan teknik molekuler adalah cepat, sensitif dan relatif lebih murah (*cost effective*), tersedianya kit komersial dan terstandar. Dapat digunakan untuk bakteri yang tidak dapat dikulturkan maupun yang dapat dikulturkan. Lebih mudah menelusuri GMO di lapangan, serta tingkat diskriminatifnya tinggi, bisa sampai strain (Tan, 2001).

Studi tentang peran dan potensi bhakteri endofit pada tanaman kentang perlu dikaji untuk dapat memanfaatkan bakteri endofit yang ada pada tanaman

kentang secara optimal. Untuk menunjang hal tersebut perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi molekuler bakteri endofit tanaman kentang. Karakterisasi molekuler bakteri endofit tersebut diperoleh melalui teknik PCR 16S rDNA.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah ;

1. Bagaimana hasil isolasi bakteri endofit pada umbi tanaman kentang ?
2. Bagaimana karakteristik molekuler bakteri endofit berdasarkan pola pita DNA menggunakan teknik PCR-RAPD 16S rDNA ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah ;

1. Mengetahui hasil isolasi bakteri endofit pada umbi tanaman kentang
2. Mengetahui karakteristik molekuler bakteri endofit berdasarkan pola pita DNA menggunakan teknik PCR-RAPD 16S rDNA

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah ;

1. Karakterisasi molekuler bakteri endofit tanaman kentang dapat dimanfaatkan dalam determinasi spesies-spesies bakteri endofit.
2. Menunjang studi peran dan potensi bakteri endofit pada tanaman kentang.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Tanaman kentang yang diperoleh dari kawasan Kota Batu dengan varietas Granola.
2. Organ yang diambil untuk isolasi bakteri endofit hanya pada bagian umbi
3. Metode penelitian yang digunakan secara deskriptif melalui teknik PCR-RAPD dengan menggunakan 2 pasang primer (27F, 1492R) dan (785F, 802R)

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Sumber daya hayati yang telah diciptakan Allah SWT pada dasarnya diperuntukkan bagi manusia untuk diolah dan dimanfaatkan bukan untuk dieksploitasi. Semua kekayaan di bumi ini tidak sia-sia diciptakan Allah SWT, namun mengandung manfaat demi kemaslahatan dan kesejahteraan manusia.

Firman Allah dalam surat Asy-Syu'araa' ayat 7-8 ;

Artinya : Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya

kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. dan kebanyakan mereka tidak beriman.(Q.S Asy-Syu'araa: 7-8)

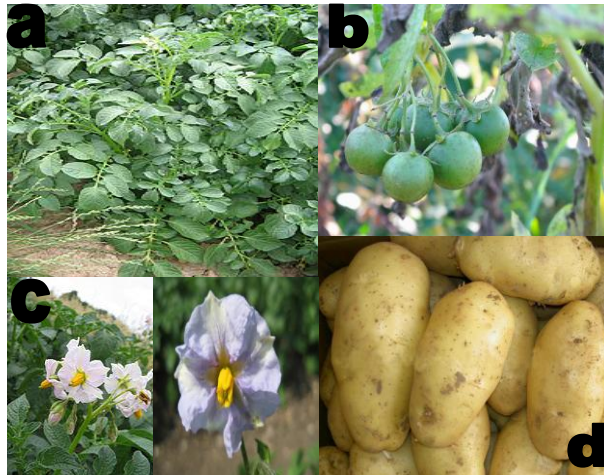
Ayat 7 dan 8 di atas mengandung pengertian bahwa dalam penciptaan tumbuh-tumbuhan terdapat tanda yang besar dan pelajaran yang tinggi, yang menunjukkan kepada hal-hal yang wajib kita imani. Hanya sayangnya kebanyakan manusia tidak mau beriman, mereka terus-menerus berada dalam kekafiran dan kesesatan (Quthb, 2004).

Tanaman kentang merupakan ciptaan Allah SWT untuk hambanya. Dimana manusia memanfaatkan sebagai bahan makanan pokok maupun sebagai sayuran. Namun dengan adanya perubahan serta kerusakan pada tanah, maka

produksi tanaman kentang terancam. Kentang yang dahulu berkembang di luar Negara Indonesia, kini dapat berkembang pesat di Indonesia. Walau harus menghadapi tantangan tersendiri dalam memeliharanya (BPPHP, 2004).

Menurut Permadi (1989), tanaman kentang masuk di Indonesia pada tahun 1794 yang telah ditemukan di sekitar Cisarua (Kabupaten Bandung) dan pada tahun 1811 tanaman kentang telah tersebar luas di Indonesia, terutama di daerah-daerah pegunungan di Aceh, Tanah Karo, Sumatera Barat, Bengkulu, Sumatera Selatan, Minahasa, Bali, dan Flores. Di Jawa daerah-daerah pertanaman kentang berpusat di daerah di Pangalengan, Lembang, dan Pacet (Jawa Barat), Wonosobo dan Tawangmangu (Jawa Tengah), serta Batu dan Tengger (Jawa Timur).

Kentang termasuk tanaman yang dapat tumbuh di daerah tropika dan subtropika, dapat tumbuh pada ketinggian 500 sampai 3000 m di atas permukaan laut, dan yang terbaik pada ketinggian 1300 m di atas permukaan laut. Tanaman kentang dapat tumbuh baik pada tanah yang subur, mempunyai *drainase* yang baik, tanah liat yang gembur, debu atau debu berpasir. Tanaman kentang toleran terhadap pH pada selang yang cukup luas, yaitu 4,5 sampai 8,0, tetapi untuk pertumbuhan yang baik dan ketersediaan unsur hara, pH yang baik adalah 5,0 sampai 6,5 (Ewing dan Keller, 1982).



Gambar. 2.1 Morfologi Tanaman Kentang, a. Tanaman kentang, b. Buah kentang, c. Bunga kentang, d. Umbi kentang (sumber : Pitojo, 2008)

Tanaman kentang ini umumnya ditanam dari umbi. Daun-daun pertama tanaman kentang berupa daun tunggal sedangkan daun-daun berikutnya berupa daun majemuk *impartipinnate* (Nurhidayah dkk, 2005). Warna bunga tanaman ini bermacam-macam, seperti putih, biru, ungu, terdapat pada tukul-tukul dengan percabangan *dikotomik* dengan ibu tangkai yang panjang. Buahnya buah buni yang bulat dengan kelopak yang tetap (Gembong, 1994).



Gambar. 2.2 Pertunasan Kentang dari Umbi (Sumber: Pitojo, 2008)

Batang di atas tanah berdiri tegak, awalnya halus dan akhirnya menjadi persegi serta bercabang jika pertumbuhannya sudah berlanjut. Bentuk pertumbuhan tanaman berkisar dari kompak hingga menyebar. Batang di bawah permukaan tanah (*rhizoma*), umumnya disebut *stolon*, menimbun dan menyimpan produk fotosintesis dalam umbi yang membengkak pada bagian ujung. Karbohidrat ditranslokasikan sebagai sukrosa ke dalam *stolon*, yang pembelahan dan pembesaran selnya menyebabkan pertumbuhan umbi. Sukrosa yang ditransportasikan dikonversi dan disimpan dalam bentuk butiran pati (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998).

2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Menurut Gembong (1994), kentang (*Solanum tuberosum* L) diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio Spermatophyta

Subdivisio Angiospermae

Class Dicotyledoneae

Ordo Tubiflorae (Solanales, Personatae)

Family Solanaceae

Genus *Solanum*

Species *Solanum tuberosum* L.

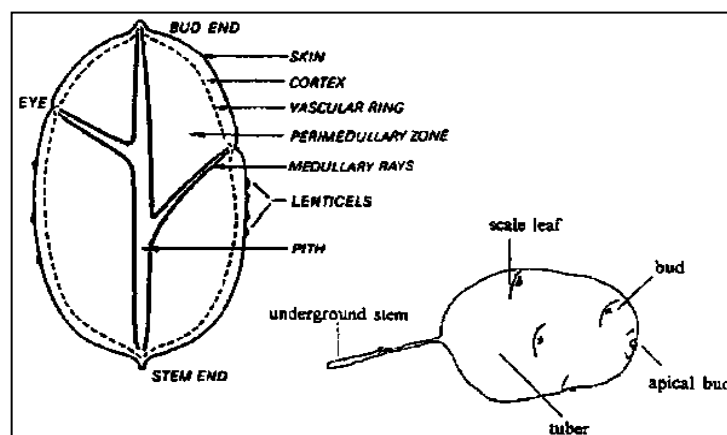
2.1.3 Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Selain mempunyai organ-organ tersebut, kentang juga mempunyai organ umbi. Umbi tersebut berasal dari cabang samping yang masuk ke dalam tanah. Cabang ini merupakan tempat menyimpan karbohidrat sehingga membengkak dan

bisa dimakan. Umbi bisa mengeluarkan tunas dan nantinya akan membentuk cabang-cabang baru. Semua bagian tanaman tersebut mengandung racun *solanin*. Begitu pula umbinya, yaitu ketika sedang memasuki masa bertunas. Namun, bagian umbi ini, bila telah berusia tua atau siap panen, racun ini akan berkurang bahkan bisa hilang, sehingga aman untuk dimakan.

Menurut Pitojo (2008) Umbi kentang merupakan umbi batang yang terbentuk dari pembesaran ujung *stolon*, mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral dan air. Air merupakan bagian terbesar dalam umbi kentang, kandungan air tersebut bias mencapai 80%.

Morfologi dari umbi adalah berbatang pendek, tebal dan memiliki daging dengan daun yang berubah menjadi kerak atau belang. Umbi berdampingan dengan tunas samping (*aksilar*), yang dikenal dengan “mata”. Tunas yang akan membentuk susunan spiral tertekan pada permukaan umbi, dengan jumlahnya yang semakin banyak mendekati titik apikal. Sebenarnya, setiap mata adalah sekelompok tunas, dan setiap tunas mampu tumbuh menjadi batang (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998). Pembentukan umbi berkorelasi positif dengan luas daun serta berhubungan dengan umur daun (Nurhidayah dkk, 2005).



Gambar. 2.3 Bagian-Bagian Anatomi Umbi Kentang (sumber: Pitojo, 2008)

Menurut Pitojo (2008) bentuk umbi, mata tunas, warna kulit dan warna daging umbi bervariasi menurut varietas kentang. Umbi kentang berbentuk bulat, lonjong, meruncing atau mirip ginjal, dengan ukuran kecil hingga besar. Pada waktu masi muda, umbi kentang di lapisi ± 1 cm dan menghasilkan *periderm*, sehingga pada umbi kentang yang sudah tua tersusun enam lapis *periderm*. Kulit umbi kentang sangat tipis, berwarna putih, kuning, merah, atau ungu. Ketebalan kulit dipengaruhi oleh varietas dan keadaan lingkungan. Pada umbi yang masih muda, sel-sel kulit membelah dengan cepat, ditandai dengan kulit yang mudah terkelupas. Pada umbi yang sudah tua, sel-sel kulit sudah tidak membelah dan kulit melekat erat sehingga tidak mudah terkelupas. Daging umbi kentang berwarna putih, kuning, atau kemerahan.

Mata tunas tersusun secara spiral pada bagian luar dan dekat kulit umbi. Mata tunas tertua terletak pada pangkal umbi. Jumlah mata tunas berkisar antara 2-14, tergantung pada besar kecilnya umbi. Mata tunas dan kulit memiliki peranan yang sangat penting dalam budi daya kentang, terutama dalam penangkaran benih. Umbi kentang mengalami masa dormansi antara 3-4 bulan (Pitojo, 2008).

2.2 Bakteri Endofit

Segala ciptaan Allah SWT memberi manfaat bagi hambanya, baik itu hal kecil. Tidak ada ciptaan Allah SWT yang sia-sia. Manusia boleh membenci akibat yang ditimbulkan oleh bakteri, virus dll, misalnya penyakit *influenza*, infeksi maupun kerusakan pada tanaman juga. Namun dibalik semua itu, ada hikmah tersendiri yang belum kita pelajari. Dalam firman Allah dalam surat An-Nahl; ayat 10-11 berbunyi:



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)” (Q.S Huud; 6).

“*daabbatin*” penggalan ayat yang dimaksud binatang melata di sini ialah segenap makhluk Allah yang bernyawa. “*mustakorrohaa, wamustauda’ahaa*” penggalan ayat selanjutnya, menurut sebagian ahli tafsir yang dimaksud dengan tempat berdiam di sini ialah dunia dan tempat penyimpanan ialah akhirat. dan menurut sebagian ahli tafsir yang lain maksud tempat berdiam ialah tulang sulbi dan tempat penyimpanan ialah rahim.

Isi kandungan pada ayat di atas, dijelaskan bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT nantinya wajib bagi kita (manusia) untuk mengkaji, meneliti dan mengaplikasikannya sehingga dapat bermanfaat bagi kehidupan manusia itu sendiri, oleh karena itu, kita sebagai makhluk yang diberi akal dan pikiran wajib untuk mengobservasi dan mengkaji segala sesuatu yang ada di alam ini baik sesuatu yang bersifat makro maupun sesuatu yang bersifat mikro. Salah satu contoh ciptaan Allah yang termasuk makro adalah alam beserta isinya, sedangkan sesuatu yang tergolong mikro adalah organisme yang tidak dapat kita lihat secara kasat mata seperti bakteri, jamur, virus dll (Goffar, 2004).

Adapun hewan yang berukuran lebih kecil (mikro) antara lain adalah mikroba. Mikroba walaupun berukuran sangat kecil dan umumnya sangat dibenci orang karena merugikan manusia, tetapi sekali lagi segala sesuatu yang diciptakan

Allah SWT di bumi ini tidak ada yang sia-sia. Mikroba ada yang merugikan, tetapi juga ada yang menguntungkan yaitu salah satunya mikroba endofit yang hidup pada jaringan tanaman dan dapat menghasilkan zat antibiotik yang sangat berguna sebagai obat.

Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang sebagian atau seluruh dari siklus hidupnya tinggal dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala penyakit. Mereka berada pada jaringan yang sehat seperti berbagai macam jaringan, biji, akar, batang dan daun. Tanaman mendapatkan manfaat dengan kehadiran bakteri endofit ini seperti memacu pertumbuhan tanaman, dan meningkatkan resistensi tanaman pada dari berbagai macam patogen dengan memproduksi antibiotik. Endofit juga memproduksi metabolit sekunder yang sangat penting bagi tumbuhan (Long, 2003).

Menurut Yunus (1999) bakteri endofit merupakan organisme yang hidup selama satu periode siklus hidup dalam jaringan tanaman, tidak termasuk mikroorganisme yang hidup di permukaan tanaman, organisme yang menyebabkan penyakit pada tanaman yaitu mikrozoa maupun rhizobium.

Mikroba endofit ini juga ditemukan pada berbagai varietas tanaman inang di seluruh dunia, termasuk pohon, semak, rumput-rumputan, lumut, tumbuhan paku dan lumut kerak (Clay, 1991). Bakteri endofit juga dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Berdasarkan sifat kerjanya bakteri endofit melawan mikroba patogen dengan cara mengganggu metabolisme sel, menghambat sintesis dinding sel, mengganggu permeabilitas dan menghambat sintesis protein dalam sel (Syarmalina, 2008).

Sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Strobel GA., et.al. 2003; Radji, 2008).

Menurut Strurz dan Christir (1998) hubungan yang terjadi antara inang dan bakteri endofit bukan merupakan hubungan patogenitas. Bakteri endofit yang terdapat dalam tanaman memacu perkecambahan, untuk bertahan dalam kondisi yang kurang menguntungkan, mempercepat pertumbuhan, ketahanan terhadap patogen lemah, dan beberapa kasus yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap tekanan lingkungan.

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya yang merupakan peluang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya. Menurut Stierle et al., (1995) dalam Susilowati (Tanpa Tahun), bahwa pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, (2) dapat diproduksi dalam skala besar.

Menurut penelitian yang telah dilakukan Harni (2004). Berdasarkan bentuknya, bakteri dibagi menjadi tiga golongan besar, yaitu:

- a. Kokus (Coccus) adalah bakteri yang berbentuk bulat seperti bola dan mempunyai beberapa variasi sebagai berikut
 1. Mikroccoccus, jika kecil dan tunggal
 2. Diplococcus, jika berganda dua-dua
 3. Tetracoccus, jika bergandengan empat dan membentuk bujur sangkar
 4. Sarcina, jika bergerombol membentuk kubus

5. Staphylococcus, jika bergerombol
 6. Streptococcus, jika bergandengan membentuk rantai
- b. Basil (Bacillus) adalah kelompok bakteri yang berbentuk batang atau silinder, dan mempunyai variasi sebagai berikut:
1. Diplobacillus, jika bergandengan dua-dua
 2. Streptobacillus, jika bergandengan membentuk rantai
- c. Spiral (Spirillum) adalah bakteri yang berbentuk lengkung dan mempunyai variasi sebagai berikut:
1. Vibrio, (bentuk koma), jika lengkung kurang dari setengah lingkaran (bentuk koma)
 2. Spiral, jika lengkung lebih dari setengah lingkaran
 3. Spirochete, jika lengkung membentuk struktur yang fleksibel.

Bentuk tubuh/morfologi bakteri dipengaruhi oleh keadaan lingkungan, medium, dan usia. Walaupun secara morfologi berbeda-beda, bakteri tetap merupakan sel tunggal yang dapat hidup mandiri bahkan saat terpisah dari koloninya.

2.2.1 Jenis-Jenis Bakteri Endofit

Mikroorganisme disebut sebagai endofit jika berada dalam tubuh tumbuhan setidaknya satu bagian dari siklus hidupnya, sehingga mikroorganisme ini tidak hanya numpang lewat atau menyebabkan penyakit (patogen). Mikroba endofit yang umum ditemukan adalah berupa bakteri dan jamur, namun jamur lebih sering diisolasi. Beberapa pihak bahkan berspekulasi bahwa masih dimungkinkan adanya beberapa jenis bakteri endofit lain, seperti *rickettsia* dan

archaeobacteria. Karena tumbuh dalam jaringan tanaman, dimana tanaman yang satu tentunya berbeda dengan tanaman lainnya, maka tempat hidup bakteri sangat unik sifatnya. Bahkan, fisiologi tumbuhan tinggi termasuk yang berasal dari spesies yang sama akan beda di lingkungan yang berbeda. Karena itu keanekaragaman bakteri endofit sangatlah tinggi. Berdasarkan pertimbangan tersebut endofit dapat menjadi sumber berbagai metabolit sekunder baru yang berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang medis, pertanian, dan industri (Prihatiningtyas, 2006).

Tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa bakteri endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi, atau metabolit sekunder. Diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam bakteri endofit sepanjang waktu evolusinya (Tan & Zhou, 2001 dalam Radji, 2005). Sejumlah mikroba endofit yang telah berhasil diisolasi dari bagian dalam beberapa tanaman pangan, yaitu pada tanaman padi, jagung, sorgum dan tebu (James dan Olivares, 1996). Ada beberapa bakteri penghasil hormon IAA yang terdapat pada tanaman tertentu dan menghasilkan fitohormon yang bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman tersebut (Hoflich, 1995 dalam Aryantha, 2005). Tumbuhan yang telah diteliti bakteri endofitnya masih sedikit. Oleh karena itu, masih ada banyak kesempatan untuk menemukan berbagai jenis, taksa endofit baru (Prihatiningtyas, 2006).

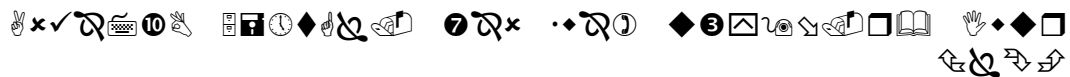
Bakteri endofit dapat juga menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang langka dan penting bagi tumbuhan inangnya, maka kebutuhan untuk menumbuhkan tumbuhan yang masa hidupnya panjang dan mungkin termasuk langka akan berkurang dan keanekaragaman hayati dunia juga terlindungi. Bakteri

digunakan sebagai sumber suatu produk hayati akan memudahkan proses dan mengurangi biaya produksi, sehingga pada akhirnya menghasilkan produk dengan harga lebih murah. Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder (Radji, 2005).

2.3 16S rDNA

rRNA merupakan gen yang paling *conserved* dalam sel. Proporsi sikuen rDNA dari organisme yang berkerabat adalah hamper sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa sikuen dari organism yang berkerabat dapat diurutkan secara persisi dan membuat perbedaannya menjadi lebih mudah untuk diukur. Gen-gen pengkode rRNA yaitu rDNA digunakan secara ekstensif untuk membedakan secara taksonomi, filogeni (hubungan kekerabatan secara evolusi) dan untuk memperkirakan tingkat divergensi spesies diantara bakteri. Perbandingan sikuen 16S rDNA dapat menunjukkan hubungan kekerabatan secara evolusi antar mikroorganisme. Dasar teori tersebut telah digunakan oleh peneliti pendahulu yaitu, Carl Woese yang mengajukan sistim klasifikasi tiga domain (*Achaeae*, *Bacteria* dan *Eucarya*) berdasarkan informasi sikuen rDNA. Sesuai dengan firman Allah dalam surat Yunus; ayat 61. Yang berbunyi:

﴿يٰٓاَيُّهَا الَّذِيْنَ اٰمَنَ لَا تَتَّبِعِ الرَّسُوْلَ فَاِذَا دَعَا اِلَى الْغِيْثِ فَطٰوْبٰى لِّمَنْ اٰمَنَ ۚ وَكَذٰلِكَ يَدْعُوْا ۚ وَلَٰكِنَّ اَكْثَرَهُمْ لَا يَعْلَمُوْنَ ۚ﴾



Artinya : Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah (atom) di bumi ataupun di langit. tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam Kitab yang nyata (Lauh mahfuzh) (Q.S Yunus ; 61).

Dalam surat Yunus ayat 61 ini, dijelaskan bahwa proses penciptaan makhluk hidup di bumi hanya Allah yang lebih tahu detailnya. Umatnya hanya diperbolehkan mengetahui sebagian kecil dari proses penciptaan tersebut. Tidak hanya itu bagian terkecil dari makhluk (DNA, RNA, dan protein) hidup pun ada dan tertulis dalam Al-Qur'an. Sehingga membantu dalam hal menganalisis segala urusan yang kecil atau besar dengan tepat dan menghasilkan data yang akurat (Quthb, 2004).

Pada bakteri *Archaea*, mitokondria dan kloroplas, sub unit kecil ribosomnya mengandung 16S rRNA (S adalah satuan unit *Svedberg*). Bakteri memiliki gen 16S, 23S, dan 5S rRNA yang terorganisir sebagai operon *cotranscribed*. Terdapat satu atau lebih salinan operon yang tersebar pada DNA genom.

Sikuen 16S rDNA memiliki bagian hipervariabel, yaitu sikuen mengalami perbedaan-perbedaan melalui proses evolusi. Primer-primer didisain untuk menempel pada bagian-bagian *conserved*-nya dan mengamplifikasi bagian variabelnya. Sikuen DNA dari gen 16S rDNA telah dapat digunakan untuk mendeterminasi banyak spesies. Menurut fakta yang ada, bahwa belum ada gen

lain yang terkarakterisasi di dalam banyak spesies selain gen 16S rDNA. Sikuen-sikuen dari 10.000an isolate di klinik maupun lingkungan telah tersedia melalui jaringan internet dan dapat diakses melalui National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) dan Ribosomal Database Project (www.eme.msu.edu/RDP/html/index.html). Situs-situs tersebut menyediakan pencarian algoritma untuk membandingkan sikuen baru yang dihasilkan dari penelitian dengan database mereka.

2.4 Identifikasi Mikroorganisme Menggunakan 16S rDNA

Metode identifikasi mikroorganisme menggunakan 16S rDNA dan berdasarkan teknik PCR telah digunakan untuk mendiagnosis spesies-spesies bakteri penyebab meningitis akut. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa penggunaan teknik tersebut dapat digunakan sebagai tes tambahan yang sangat berarti dalam pemeriksaan rutin di klinik untuk diagnosis bakteri penyebab meningitis akut di rumah sakit (Chakrabarti *et all*, 2009).

Isolasi dan karakterisasi koloni bakteri endofit dari tanaman agronomi dan taman padang rumput di daerah Nabraska, Amerika telah dilakukan oleh Zinniel dkk (2000). Identifikasi taksonominya dilakukan dengan annalisa biokimia dan analisa terhadap sikuen 16S rDNA.

Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit pada kedelai (*Glycine* sp) telah dilakukan oleh Hung Annapurna pada 2004. Karakterisasi molekulernya dilakukan menggunakan teknik PCR-RFLP 16S rDNA. Karakterisasi dari 35 isolat bakteri endofit yang diperoleh dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16S rDNA kemudian dilakukan analisis retriksi menggunakan enzim retriksi *HaeIII*, *Mbol*

dan *Mspl*. Terdapat 2 kluster utama dengan koefisien kesamaan 48% dan 43% dan 6 isolat yang berbeda kluster.

Elevazhagan dkk, (2009), telah melakukan isolasi bakteri endofit dari tanaman *Mikania micrantha* dan melakukan karakterisasi molekulernya menggunakan teknik PCR-RAPD terhadap sikuen DNA genom berdasarkan 16S rDNA. Tim peneliti tersebut berhasil mengkarakterisasi 5 isolat hasil isolasi bakteri endofit dari bagian daun, petiole, batang, dan akar. Hasil analisis amplifikasi RAPD 16S rDNA nya menunjukkan kesamaan dan menunjukkan kelimanya berasal dari genus *Bacillus*.

2.5 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR atau polimerisasi berantai adalah teknik amplifikasi (perbanyak) DNA spesifik dengan melakukan proses pemanjangan nukleotida dari primer yang merupakan pasangan komplementer dari utas DNA secara simultan. Proses pemanjangan nukleotida dilakukan oleh DNA polimerase berdasarkan cetakan DNA (Bardacki, 1994).

Menurut Kapil (2009), tahap-tahap PCR meliputi tahap denaturasi, penempelan primer pada cetakan DNA (*annealing*) dan tahap pemanjangan primer melalui reaksi polimerisasi nukelotida (*extention*).

2.5.1 Denaturasi

Tahap ini merupakan tahap pengudaran DNA utas ganda menjadi DNA utas tunggal, dimana masing-masing untai dapat mencetak pasangannya (komplementer). Denaturasi berlangsung pada suhu 90-95°C.

2.5.2 Penempelan primer pada cetakan DNA (*annealing*)

Tahap ini merupakan tahap penempelan primer pada utas DNA cetakan yang telah terdenaturasi menjadi utas tunggal akibat kecocokan pasangan basa. Umumnya penempelan terjadi pada suhu 55-57°C untuk primer 20 mer dan 34-40°C untuk primer 10 mer. Suhu penempelan primer yang ideal umumnya adalah 5°C di bawah suhu leleh (T_m) dari tiap primer (Sambrook et al., 1989).

2.5.3 Pemanjangan primer DNA

Setelah primer menempel pada utas tunggal DNA cetakan, maka DNA polimerase akan mensintesis utas DNA yang baru berdasarkan utas DNA cetakan. DNA polimerase mulai mensintesis DNA dengan mengikatkan deoksinukleotida pada ujung 3'-OH dari primer, sehingga arah pertumbuhan utas DNA yang baru adalah 5'-P ke 3'-OH. Sintesis DNA atau pemanjangan primer ini dilakukan pada suhu cukup tinggi, yaitu sekitar 72°C supaya tahap berikutnya (denaturasi protein) relatif lebih mudah dan enzim Taq DNA polimerase dapat bekerja optimal.

Ketiga tahap di atas akan berulang beberapa kali sehingga proses amplifikasi DNA dapat terjadi. Untuk memudahkan proses reaksi berantai ini, maka reaksi dilakukan oleh mesin PCR. Mesin PCR terdiri dari suatu alat pemanas dan pendingin yang dapat diprogram sehingga dapat memanaskan pada suhu dan selang waktu yang dikehendaki untuk setiap siklus pada suatu reaksi. Banyaknya pengulangan sangat tergantung dari kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis DNA dan biasanya berkisar antara 25 dan 40 siklus. Reaksi polimerisasi ini berantai atau berulang, maka dibutuhkan primer dalam jumlah relatif banyak. Efisiensi reaksi dapat dilakukan dengan perlakuan pra-PCR pada

suhu 95°C selama 5 menit untuk mendenaturasi DNA cetakan yang ukurannya relatif besar. Setelah reaksi selesai, biasanya ditambahkan perlakuan pasca-PCR pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dapat dilihat dengan melakukan migrasi di dalam gel (elektroforesis).

Menurut Sambrook et al., (1989) Kegagalan reaksi PCR selain karena tidak sempurnanya denaturasi atau suhu *annealing* yang terlalu tinggi, juga disebabkan oleh beberapa faktor lain diantaranya :

1. Konsentrasi DNA cetakan

Proses PCR tidak memerlukan DNA dengan tingkat kemurnian tinggi, namun amplifikasi akan terganggu apabila DNA cetakan masih banyak yang terkontaminasi dengan deterjen, EDTA maupun fenol. Konsentrasi DNA yang dibutuhkan adalah 10-100 ng untuk setiap reaksi.

2. Pemicu reaksi

Primer adalah rantai utas tunggal DNA yang pendek dan terdiri dari beberapa nukleotida. Umumnya terdiri atas 10-25 nukleotida (oligonukleotida). Primer yang biasa digunakan dalam percobaan adalah primer acak dan primer spesifik. Primer acak adalah primer yang susunan basa nukleotida seimbang sehingga dapat digunakan untuk analisis DNA dengan sampel yang belum diketahui susunan basa nukleotidanya. Primer spesifik adalah primer yang susunan basa nukleotidanya telah diketahui dan merupakan komponen dari utas DNA yang akan dianalisis.

3. Enzim Taq DNA Polimerase

Pada proses replikasi DNA diperlukan adanya enzim untuk polimerisasi jalinan DNA. Enzim yang mampu mengkatalis replikasi DNA

disebut DNA polimerase dan jenis yang biasa digunakan adalah Taq. Enzim ini bersifat termostabil, yang berasal dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus* yang dapat bertahan hidup pada suhu 94°C. Taq DNA polimerase bekerja secara optimum.

Pada suhu 75-80°C dan digunakan untuk membantu amplifikasi potongan primer dan proses pemanjangan DNA. Aktivitas enzim ini akan terhambat oleh adanya bufer fosfat, tetapi akan aktif apabila ditambahkan 10 mM tris dalam bufer pada suhu ruang dengan pH 8.3 (Sambrook et al. 1989). Taq DNA polimerase mulai aktif pada pH 8.2 - 9.0 dan suhu 65 - 72°C.

4. dNTP

dNTP yang digunakan berupa campuran dari keempat macam nukleotida yaitu dATP, dGTP, dTTP dan dCTP. Larutan stok dNTP bersifat netral pada pH sekitar 7.0. Konsentrasi dNTP yang digunakan berkisar antara 0.1 - 1.6 mM untuk setiap reaksi. dNTP masih bersifat stabil sampai proses siklus berulang 50 kali hanya berkurang 50% (Newton, 1995).

5. Mg^{2+}

Mg^{2+} mempengaruhi aktivitas enzim Taq DNA polimerase karena ion Mg^{2+} berfungsi sebagai kofaktor yang dapat membentuk kelat dengan larutan EDTA. Ion ini berperan dalam ke stabilan primer pada tahap penempelan primer.

6. Bufer

Bufer PCR terdiri atas larutan Tris-HCl dengan konsentrasi 10-50 mM dan pH 8.3 - 8,8 serta berperan dalam keberhasilan proses amplifikasi (Innis dan Gelfand, 1990). Proses penempelan primer pada bufer PCR dapat ditambahkan KCl dengan konsentrasi 50 mM.

2.6 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-RAPD

PCR-RAPD merupakan salah satu teknik molekuler berupa penggunaan penanda tertentu untuk mempelajari keanekaragaman genetika. Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi siklus DNA secara in vitro. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai dengan kebutuhan. Tiap primer boleh jadi berbeda untuk menelaah keanekaragaman genetic kelompok yang berbeda. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrase, terutama karena amplifikasi DNA secara in vitro dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR (Suryanto, 2001; Setiyono, 2011).

Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relative tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya. Pada tanaman tahunan RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal.

Teknik RAPD sering digunakan untuk membedakan organisme tingkat tinggi (*eucaryote*). Namun demikian beberapa peneliti menggunakan teknik ini untuk membedakan organisme tingkat rendah (*Procaryote*) atau melihat perbedaan organisme tingkat rendah melalui piranti organel sel seperti mitokondria (Suryanto, 2001; Setiyono, 2011).

Penggunaan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) yang penggandaannya memakai teknik PCR pertama kali digunakan oleh Welsh dan McClelland pada tahun 1990 sebagai penanda genetik. Teknik ini relative sederhana karena hanya menggunakan sejumlah kecil (beberapa nanogram) DNA total genom yang dianalisis sudah dapat terdeteksi pola pitanya dan oligonukleotida primer yang digunakan relative pendek yaitu 10-mer sampai 20-mer. Pada reaksi ini primer acak tunggal akan menempel pada DNA yang berlawanan. Jika tempat penempelan primer yang satu dengan yang lainnya berada dalam jarak yang dapat diamplifikasi mereka akan memperoleh satu atau lebih fragmen DNA hasil amplifikasi tersebut, dengan penggunaan teknik PCR maka penggandaan DNA secara invitro dapat dilakukan dengan cepat dengan hasil yang baik. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil amplifikasi seperti konsentrasi DNA, ukuran panjang primer, komposisi primer, konsentrasi ion magnesium dan jumlah unit *taq-polymerase* yang digunakan harus dikontrol secara hati – hati (Tingey et al., 1983).

Beberapa alasan yang digunakan orang sehingga memilih teknik RAPD ini yaitu (1) tidak diperlukan pengetahuan latar belakang genom yang dipelajari, (2) secara cepat hasil RAPD dapat diperoleh terutama jika dibandingkan dengan analisis RFLP yang memerlukan banyak tahapan dan (3)

beberapa jenis atau set universal acak yang umum secara komersial telah tersedia dan dapat digunakan untuk analisis genomik pada hampir semua jenis organisme (McClelland, 1990; William et al., 1990)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2012 sampai bulan Juli 2012, yang bertempat di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Instrumen Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, LAF (*Laminar Air Flow*), tabung reaksi, *beacer glass*, pengaduk kaca, pinset, blade, mikropipet, vortex, labu erlenmeyer, kompor listrik, pipet tetes, autoklaf, mikroskop computer, objek glass, deck glass, mikrosentrifus, rotary-shaker, tube, spektrofotometer, PCR, dan elektroforesis horizontal.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) varietas Granola yang diperoleh dari perkebunan daerah sumber brantas, Kota Batu, Jawa Timur. Sampel berupa akar, umbi dan batang. Media penumbuhan bakteri yang digunakan YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Agar*), LB (*Luaria Bertani*) dan cat gram. Larutan pelisis, larutan RNase, Larutan PP, Etanol 70%, Primer, gel agarose 1,5 %, larutan TBE, dan EtBr.

3.3 Kegiatan Penelitian

3.3.1 Sterilisasi Alat-Alat

Terlebih dahulu alat dan bahan yang digunakan harus disterilkan, untuk alat-alat gelas dan cawan petri setelah dicuci dikeringkan. Selanjutnya dibungkus dengan kertas atau ditutup dengan kapas (untuk tabung) dan dimasukkan dalam plastik tahan panas. Suhu yang digunakan pada saat sterilisasi adalah suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 20 menit.

3.3.2 Isolasi Bakteri Endofit

S. tuberosum diperoleh dari perkebunan kentang sekitar Kota Batu, Malang Jawa Timur. Sampel berupa umbi kentang, untuk mengisolasi bakteri endofit dari bagian umbi tanaman kentang. Pertama mencuci umbi tanaman kentang dengan air mengalir dan membilasnya dengan akuades steril. Kemudian dipotong-potong kecil berukuran sekitar 1cm, dan keringkan dengan tissue. Potongan tersebut digunakan untuk isolasi bakteri endofit. Dalam isolasi bakteri endofit ini digunakan medium YPDA (*Yest Potato Dextrose Agar*).

3.3.3 Pembuatan Media YPDA (*Yest Potato Dextrose Agar*)

Dalam pembuatan media YPDA, yang dilakukan pertama kali adalah YPDA ditimbang dengan takaran (*Yest* = 0,3g. *Potato* = 0,06g. *Dextrose* = 0,3g. *Agar* = 1,5g). Kemudian, ditambahkan akuades sebanyak 100ml pada YPDA. Setelah itu YPDA yang telah ditambahkan dengan akuades dipanaskan hingga mendidih. Jika sudah mendidih, media YPDA tersebut diangkat dan dituang ke dalam tabung reaksi (15 buah) dan cawan petri (5 buah), dengan takaran 10 ml

tiap tabung atau cawan. Langkah terakhir menutupnya kembali atau menggunakan kapas untuk tabung reaksi.

3.3.4 Kultur Bakteri Endofit

Isolat bakteri endofit yang telah dipilih (dari 6 kultur, masing-masing satu isolat) diperbanyak secara terpisah pada masing-masing 10 ml media YPDA miring pada tiap-tiap tabung reaksi. Selain itu dilakukan pemindahan bakteri endofit pada media LB (*Luria Bertani*) dengan 10 ml pada tiap-tiap tabung reaksi.

3.3.5 Isolasi DNA Genom dari Isolat Bakteri Endofit Secara Konvensional

ekstraksi DNA yang dilakukan menggunakan teknik dari (Sambork 2001). Dengan melewati 2 tahap yaitu isolasi DNA dan preparasi DNA. Berikut adalah tahapan ekstraksi DNA bakteri endofit;

a. Pemisahan Pelet dengan Media kultur

Isolat bakteri yang telah murni, masing-masing ditumbuhkan dalam media LB (*Luria Bertani*) cair. Bakteri ditumbuhkan selama 18-24 jam pada suhu 28°C dalam rotary shaker dengan kecepatan 150-200 rpm. Kemudian bakteri dipanen sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam eppendorf, disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Pelet yang telah mengendap dalam eppendorf, dikeringkan dan kemudian dicuci dengan gliserol 20% sebanyak 100µl.

b. Isolasi DNA Tahap 1

1. Pelet diambil sebanyak 40 μ l, dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian ditambahkan 1ml STE kedalam tabung eppendorf yang berisi pelet.
2. Tabung eppendorf yang berisi pelet divorteks agar homogen, dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Jika sudah, supernatan dibuang dan tabung eppendorf dikeringkan dengan tissue. Agar sisa STE tidak mengganggu saat isolasi berlangsung.
3. Pelet yang berada dalam tabung eppendorf, kemudian ditambahkan 200 μ l lysozym (50 mg/ μ l) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam (setiap 15 menit dibolak-balik).
4. Setelah itu, pelet tersebut ditambahkan 200 μ l buffer lisis, dibolak-balik sampai larut ($\pm$ 1 menit), dan hati-hati jangan sampai tutup kurang rapat.
5. Jika sudah, tambahkan Klorofom Isoamil sebanyak 1x volume supernatant. Ditambahkan pula 100 μ l fenol, bolak-balik hingga larut. Kemudian sentrifius selama 10 menit dengan 13.000rpm, hingga tampak DNA, protein dan RNA yang memisah.
6. Pindahkan DNA yang ada pada permukaan dengan menggunakan tip tumpul pada eppendorf yang baru.

c. Preparasi DNA Tahap 2

1. Supernatant yang dipindah pada ependorf baru, ditambahkan Clorofom Isoamil untuk mengetahui protein ikut atau tidak. Choloroform isolamil tersebut sebanyak 1x volume supernatan. Kemudian disentrifugasi 13.000rpm selama 10 menit.
2. Pindahkan kembali DNA yang ada dipemukaan kedalam tabung eppendorf baru jika protein masih ikut.
3. Tambahkan Na Asetat 3M pH 5,2 sebanyak 1/10 volume supernatant, dan tambahkan juga ethanol absolute sebanyak 2x volume supernatant pada eppendorf berisi supernatant tersebut.
4. Kemudian diinkubasi pada suhu dingin atau 4°C selama 2 jam. Setelah diinkubasi sampel tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Jika sudah, buang supernatant dan sisakan pelet pada tabung eppendorf.
5. DNA dalam bentuk pelet dicuci dengan 500µl ethanol 70% dingin, disentrifugasi perlahan 1000rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan dikeringkan selama 10-15 menit untuk menguapkan ethanol yang masih tersisa.
6. Langkah terakhir dalam ekstraksi DNA adalah penambahan Tris EDTA 50µl dan selanjutnya DNA disimpan pada suhu -20°C untuk keperluan selanjutnya.

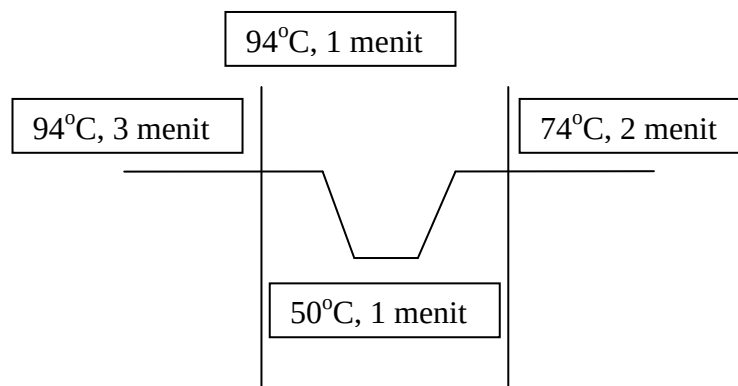
3.3.6 Amplifikasi Menggunakan PCR

Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan dengan melalui reaksi berantai *polymerase* (PCR). Isolasi DNA genom dari isolat bakteri endofit diamplifikasikan menggunakan teknik PCR dengan primer 27F dan 1492R;

27F – (5' AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG 3') – FORWARD

1492R – (5' TAC GG(CT) TAC CTT GTT ACG A 3') – REVERSE

PCR berjalan selama ± 27 siklus dengan suhu awal 94°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan selama 1 menit, diturunkan suhu 50°C selama 1 menit dan suhu terakhir adalah 72°C selama 2 menit.

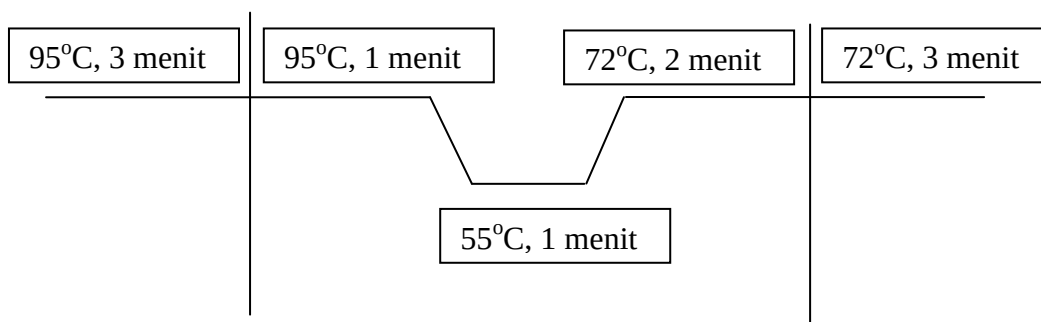


Primer yang digunakan pertama merupakan primer yang khusus digunakan untuk bakteri, diambil dari gen 16S rDNA. Sedangkan primer yang kedua ini, merupakan primer yang umumnya digunakan pada semua jenis bakteri.

785F - (5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC-3') - Forward

802R - (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') - Revers

Maka digunakan primer umum dari gen 16S rDNA ini untuk perbandingan pada primer pertama. Dengan ketentuan siklus pada PCR sebagai berikut;



PCR berjalan selama ± 40 siklus dengan suhu awal 95°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan selama 1 menit, diturunkan suhu 55°C selama 1 menit, dinaikkan kembali pada suhu 72°C selama 2 menit, dan suhu terakhir adalah 72°C selama 3 menit.

3.3.7 Elektroforesis Gel Agarosa

Kemurnian DNA sampel diuji melalui elektroforesis gel. Sampel dan sebuah marker DNA ladder 500kb dielektroforesis untuk konfirmasi kemurnian DNA. Pembuatan gel agarosa 1,5% dalam larutan buffer TBE 1x yang mengandung etidium bromide (0,5 µg/ml) dan perangkat elektroforesis (Bio-Rad) disiapkan sesuai prosedur standar.

3.3.8 Analisis Data

Analisa dilakukan secara deskriptif terhadap pita-pita DNA pada hasil gel elektroforesis hasil Genom, dan PCR. Hasil pemotretan profil DNA (pola pita DNA) dengan teknik RAPD selanjutnya diterjemahkan kedalam data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita dengan ketentuan nilai 1 (satu) apabila ada

pita dan nilai 2 (dua) apabila tidak ada pita pada satu posisi yang sama dari setiap individu yang dibandingkan. Hasil dari data selanjutnya dilakukan penentuan pola pita RAPD sebagai pita yang dikategorikan fragmen yang dihasilkan tidak muncul pada beberapa sampel. Apabila semua pita muncul pada semua populasi dikategorikan sebagai spesifik marker.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Isolasi Bakteri Endofit

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap 6 isolat dari tanaman umbi kentang, hasil isolasi serta bentuk morfologi koloni bakteri endofit tiap isolatnya ditunjukkan dalam table 4.1 di bawah ini;

Tabel 4.1 Morfologi Koloni dan Pewarnaan Gram dari Isolat Bakteri Endofit

Isolat	Karakteristik					
	Morfologi Koloni				Gram	Morfologi Sel
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna		Bentuk
Umbi 1	<i>Tidak beraturan</i>	<i>Terdapat lengkungan</i>	<i>Tidak cembung</i>	Putih kekuningan	Negatif	<i>Bacillus</i>
Umbi 2	<i>Tidak beraturan</i>	<i>Terdapat lengkungan</i>	<i>Tidak cembung</i>	Putih susu	Negatif	<i>Bacillus</i>
Umbi 3	<i>Tidak beraturan</i>	<i>Terdapat lengkungan</i>	<i>Tidak cembung</i>	Putih susu	Negatif	<i>Bacillus</i>
Umbi 4	<i>Bulat</i>	<i>Rata</i>	<i>Cembung</i>	Putih susu	Negatif	<i>Bacillus</i>
Umbi 5	<i>Tidak beraturan</i>	<i>Terdapat lengkungan</i>	<i>Tidak cembung</i>	Putih kekuningan	Negatif	<i>Bacillus</i>
Umbi 6	<i>Tidak beraturan</i>	<i>Terdapat lengkungan</i>	<i>Cembung</i>	Putih kekuningan	Negatif	<i>Bacillus</i>

Berdasarkan tabel 4.1 diketahui bahwa bakteri endofit pada bagian umbi memiliki bentuk koloni yang *tidak rata*. Yakni bentuk koloni yang membentuk lingkaran namun tepinya tidak rata. Untuk bentuk koloni yang *tidak rata* memiliki sudut *tidak cembung*, dimana pada tepi terdapat lengkung yang lain. Untuk permukaan koloni menunjukkan *halus mengkilat* dan memiliki warna *putih susu* atau *putih kekuningan*, serta tepian yang *terdapat lengkungan-lengkungan baru*. Sedangkan pada pengamatan agar miring, bakteri endofit yang telah murni menjadi berbagai bentuk. Diantaranya ada yang *menyeruapai garis lurus namun*

terdapat lengkungan-lengkungan kecil di sekitarnya dan juga membentuk garis yang mengikuti goresan jarum inokulum namun pertumbuhannya tebal.

Dikatakan bakteri endofit jika warna pada permukaan koloni yaitu putih kekuningan, atau putih kental seperti susu. Selain itu bakteri endofit di cirikan dengan bentuk sel individu yang batang, serta bentuk koloni yang bulat, oval atau tidak beraturan. Bakteri endofit tergolong bakteri gram negatif atau positif. Dinding sel bakteri gram positif mempunyai lapisan tunggal (mono), sedangkan bakteri gram negatif tersusun dari 3 lapisan yaitu lapisan luar, lapisan tengah dan lapisan dalam. Suhu optimum untuk bakteri endofit dapat tumbuh adalah antara 27°C-30°C (Pelczar, 1986)

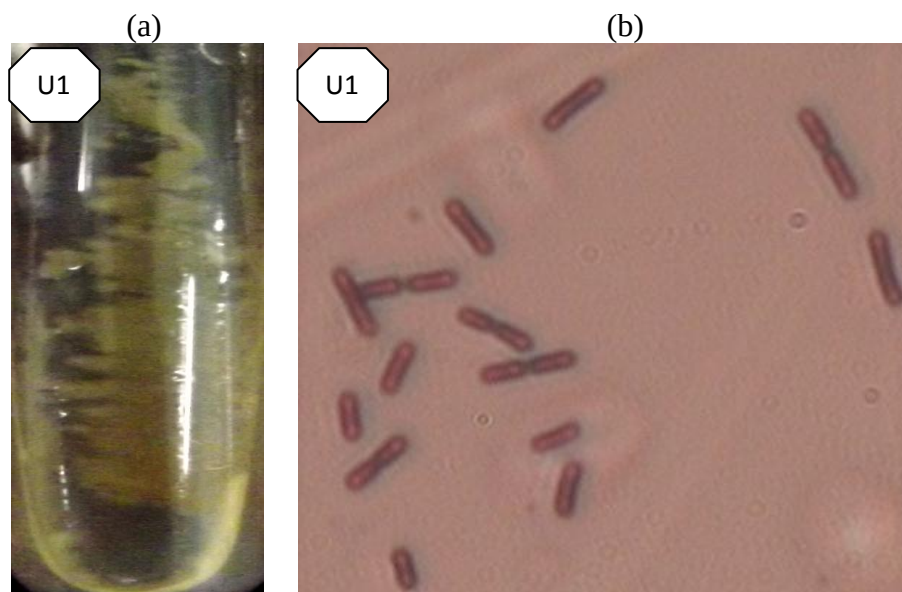
Pengamatan gram (+) dan gram (-) pada isolat umbi menunjukkan bahwa. Bakteri endofit pada isolat (1, 2, 3, 4, 5 dan 6) merupakan bakteri gram (-) dengan bentuk *bacillus*. Dikatakan gram negatif karna terdapat sisa *Safranin* yang mewarnai sel bakteri maka menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif tidak terpengaruh. *Counterstain* hanya berfungsi sebagai pengontras saja.

Pewarnaan gram berguna untuk membedakan gram positif dan gram negatif. Menurut Lay (1994) menyatakan, perbedaan hasil pewarnaan disebabkan oleh adanya perbedaan struktur kedua kelompok bakteri sehingga terjadi perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna. Penambahan larutan pemucat. Selain itu pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan gram dibagi menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan

membran sel selapis. Sedangkan baktri gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada di antara dua lapis membran sel.

4.1.1 Isolat U1 (Umbi 1)

Koloni bakteri endofit pada isolat U1 berbentuk bulat tidak rata atau tidak beraturan, tepinya tidak rata, permukaan halus mengkilap dan mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan yang semakin pekat pada medium YPDA. Secara individu bakteri berbentuk batang (*Bacillus*). Bakteri endofit dengan kode U1, secara makroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.1 di bawah ini:

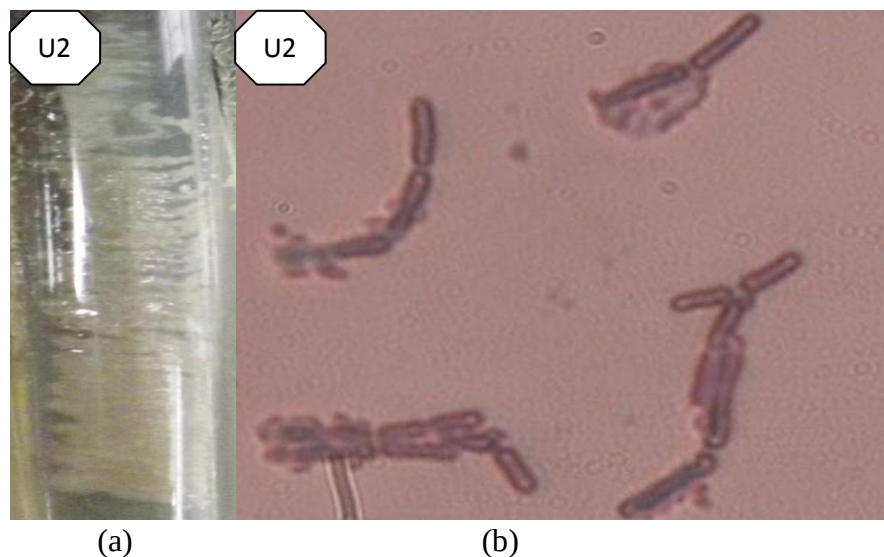


Gambar 4.1 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U1 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik

Menurut penelitian Fatikin (2009) Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa bentuk isolat bakteri endofit adalah batang, selain itu isolat bakteri endofit didominasi oleh bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri endofit ini memiliki permukaan koloni yang putih kekuningan dan selalu mengeluarkan cairan berupa lendir dalam waktu 3x24 jam

4.1.2 Isolat U2 (Umbi 2)

Koloni bakteri endofit pada U2 memiliki bentuk koloni yang tidak beraturan, tepi koloni tidak rata, dan elevasinya juga tidak cembung atau terdapat lengkungan-lengkungan yang lain. Koloni bakteri ini mengeluarkan pigmen berwarna putih susu sedikit pekat pada medium YPDA. Secara individu bakteri berbentuk batang serta merupakan bakteri endofit yang bersifat negatif.



Gambar 4.2 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U2 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Makroskopik dengan Perbesaran 1000 X

4.1.3 Isolat U3 (Umbi 3)

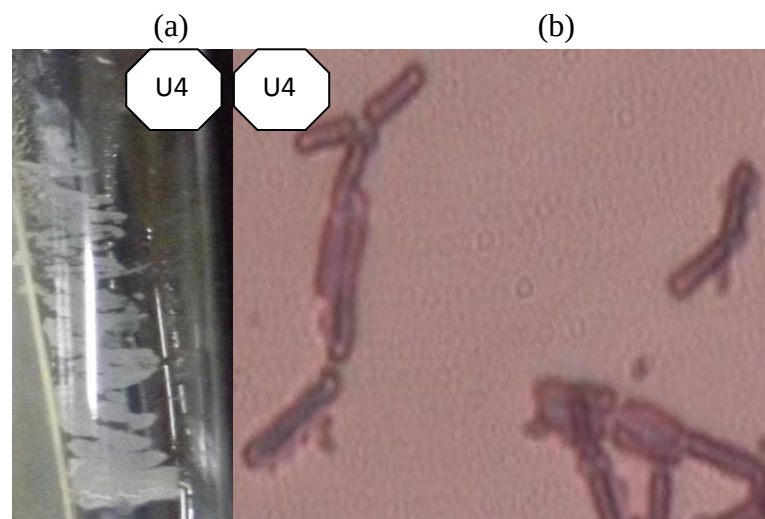
Isolat U3 memiliki koloni yang mengeluarkan pigmen berwarna putih susu pekat pada medium YPDA, dan memiliki bentuk koloni tidak beraturan, dengan sudut yang tidak cembung dan tepi yang tidak rata juga. Bentuk sel bakteri berbentuk batang. Koloni bakteri endofit dengan kode U3, secara makroskopis bentuk bakteri endofit dapat dilihat pada Gambar 4.3;



Gambar 4.3 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U3 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Makroskopik dengan Perbesaran 1000 X

4.2.3 Isolat U4 (Umbi 4)

Koloni bakteri berbentuk bulat, tepi rata, permukaannya halus mengkilat dan mengeluarkan pigmen berwarna putih susu pada medium YPDA. Secara individu bakteri berbentuk batang. Bakteri ini termasuk bakteri aerobik, tetapi juga dapat menjadi anaerobik fakultatif. Koloni bakteri endofit dengan kode U4, secara makroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.4 di bawah ini:

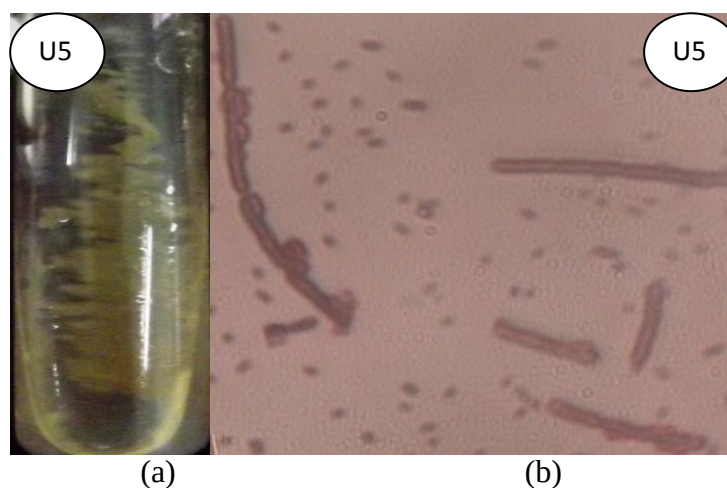


Gambar 4.4 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U4 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik

Bakteri yang aerobik dan terkadang anaerobik merupakan bakteri yang digolongkan ke dalam bakteri gram negatif. Selain itu permukaan koloni bakteri ini akan cenderung berwarna putih, halus dan tidak basah. Bakteri yang tergolong dalam kriteria ini sering disebut sebagai bakteri endofit yang terletak pada jaringan akar tanaman (Radji, 2005).

4.1.5 Isolat U5 (Umbi 5)

Sedangkan pada isolate U5 dan U6, secara makroskopis koloni bakteri berbentuk bulat tidak rata, tepi tidak rata dan permukaan halus mengkilap serta mengeluarkan pigmen berwarna putih kekuningan yang semakin pekat pada medium YPDA. Secara individu bakteri berbentuk batang (*Bacillus*). Koloni bakteri endofit dengan kode U5, secara makroskopis dapat dilihat pada Gambar 4.5 di bawah ini;

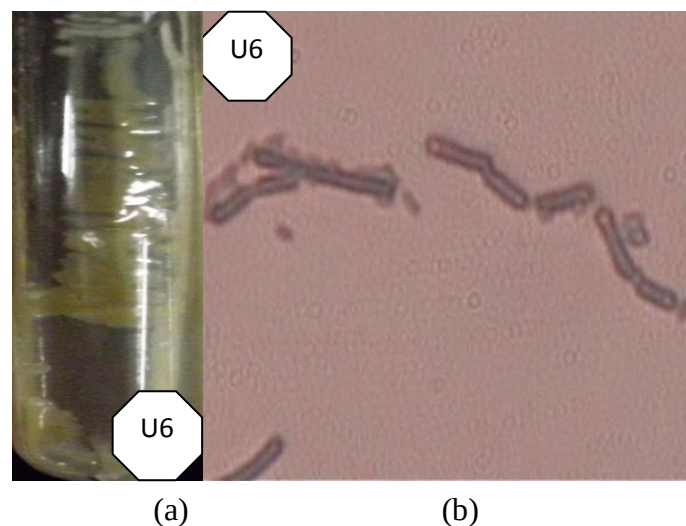


Gambar 4.5 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U5 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit (U5) Secara Mikroskopik

Menurut Buckle (1985) Bakteri endofit yang bentuk selnya batang kecil, dapat bergerak, umumnya berflagel polar tunggal dan mempunyai tipe metabolisme yang bersifat oksidatif. Bakteri ini digolongkan kedalam bakteri gram negatif (-).

4.1.6 Isolat U6 (Umbi 6)

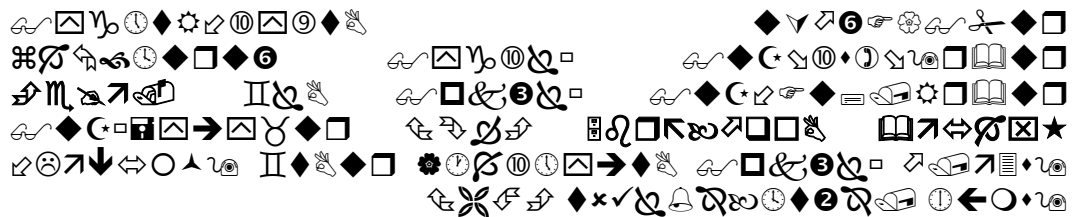
Isolat U6 ini memiliki bentuk koloni yang tidak beraturan, karna tepi koloni terdapat lengkungan-lengkungan lain, namun sudut atau elevasinya cembung. Isolat ini juga digolongkan pada bakteri gram negatif, selain itu bentuk sel bakteri endofit secara mikroskopis berbentuk batang (*Bacillus*). Berikut adalah gambar 4.6, isolat serta sel bakteri endofit dengan kode isolat U6;



Gambar 4.6 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode U6 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit (U6) Secara Mikroskopik

Penelitian ini membuktikan bahwa dalam umbi tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) ditemukan adanya bakteri endofit. Dari pernyataan di atas, menunjukkan banyaknya kekayaan alam yang telah Allah ciptakan yang

seharusnya dapat dimanfaatkan bagi kemaslahatan manusia, sebagaimana firman Allah dalam surat Al-Hijr ayat 19-20:



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. (QS. Al- Hijr/15: 19-20)

Ayat di atas menjelaskan bahwa semua kekayaan alam yang ada di bumi diciptakan Allah untuk kemaslahatan hidup manusia. Karena semuanya yang ada di alam baik yang hidup maupun yang mati, yang kecil maupun yang besar sudah pasti memiliki manfaat masing-masing. Dan telah dijelaskan bahwa di bumi ini Allah telah menumbuhkan berbagai jenis tumbuhan menurut timbangan dan ukuran masing-masing, maka tidak ada sesuatu tumbuhan yang tidak terukur unsur-unsur yang tidak mengandung faedah. Semua tumbuhan mempunyai hikmah dan maslahat walaupun itu tidak diketahui oleh banyak manusia (As-Shiddieqy, 2000).

Allah SWT telah menciptakan dan menghidupkan mikroba endofit di dalam jaringan tumbuhan yang mana senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan bermanfaat bagi kelangsungan hidup tumbuhan itu sendiri dan makhluk ciptaan Allah lainnya. Dalam sebuah hadits yang di riwayatkan imam Bukhari berbunyi:

عن ابى هريرة قال : قال رسول الله صلى الله عليه وسلم إذا وقع الذبابُ في شرابٍ أحدِكُم فليغمسه ثم لينزعه فإن في أحد جناحيه داءٌ وفي الآخر سقاءٌ (أخرجه بخارى)

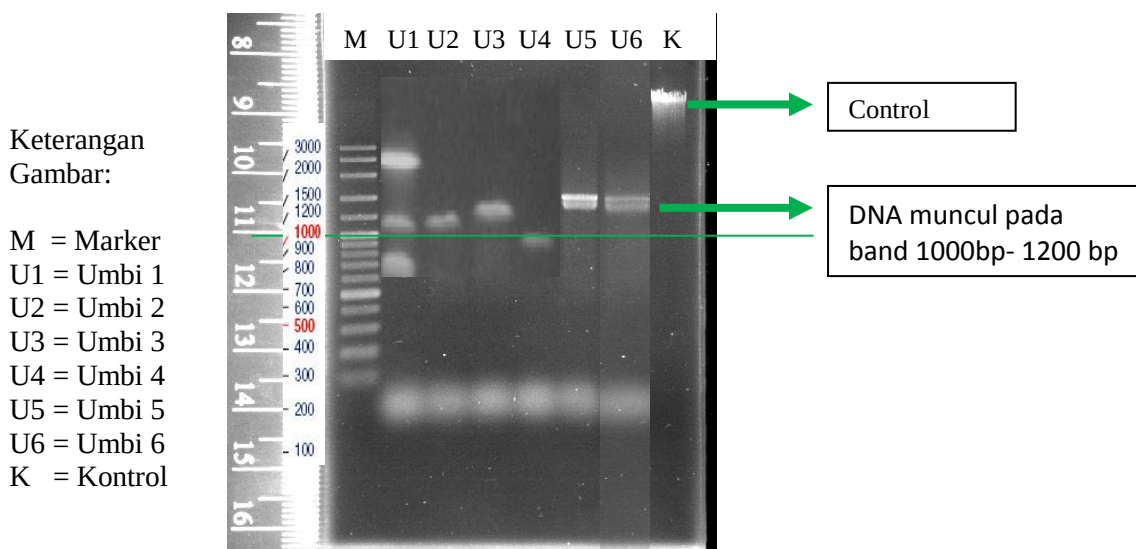
Artinya: Dari abu hurairah berkata, Rasulullah SAW bersabda: “Bila ada lalat yang jatuh di dalam minuman salah satu di antara kalian semua maka tenggelamkanlah kemudian ambillah lalat itu karena sesungguhnya di salah satu kedua sayap lalat itu ada satu penyakit dan sayap yang lain terdapat obat” (HR. Bukhori).

Hadits tersebut memberi pandangan pada manusia bahwa obat-obatan bisa diperoleh dari mana saja termasuk dari organisme itu sendiri, yang mana dari hadits tersebut memberi contoh pada seekor lalat yang memiliki dua sisi yang berbeda. Di mana sayap yang satu mengandung penyakit sedangkan sayap yang lain mengandung obat. Hal tersebut dapat diaplikasikan terhadap tanaman kentang yang mana dalam akar tanaman kentang yang terserang penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan jamur patogen ternyata di dalam jaringan akar tanaman terkandung bakteri yang berperan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur patogen tersebut.

4.2 Karakteristik Molekuler Bakteri Endofit Berdasarkan Pola Pita DNA

Menggunakan Teknik PCR-RAPD 16S rDNA

PCR yang telah dilakukan, akan dilihat hasilnya pada elektroforesis. Dari hasil elektroforesis ini maka akan diketahui maksimal atau tidak hasil elektroforesis tersebut. Hasil elektroforesis tersebut terlihat pada gambar 4.7 dibawah ini;



Gambar 4.7 Elektroforesis Hasil PCR (sesudah PCR Primer Pertama)

Dilihat dari hasil elektroforesis tampak bahwa adanya perpindahan DNA dari kutub negatif ke kutub positif. Dimana panjang basa yang dihasilkan adalah pada ukuran 1000bp-1200 bp, walau pada ukuran basa yang lain juga muncul. Namun semua sampel menunjukkan pola pita DNA yang sama pada basa ke 1000bp-1200bp.

Walau besar sampel sama banyak yang dimasukkan kedalam *well*, itu tidak menentukan panjang basa yang terbaca saat PCR. Ini menandakan adanya perbedaan yang sangat jelas pada tiap spesies, karena pola pita DNA yang muncul pada tiap sampel berbeda.

Panjang urutan basa gen 16S rDNA adalah 400-500 pasang basa. Adanya mutasi ataupun perbedaan basa pada urutan basa tersebut dijadikan sebagai penentu identifikasi suatu bakteri pada tingkat genus, spesies bahkan sampai galur (Tannock, 2004).

Berdasarkan pita-pita DNA yang dihasilkan tersebut, dilihat pola-pola pita DNA berdasarkan jumlah dan ukuran pita DNA-nya. Kalau jumlah dan ukuran

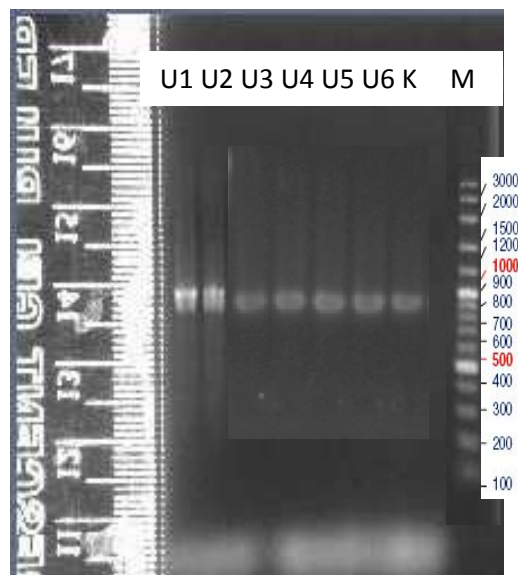
pita DNA-nya sama (monomorfik), maka secara genetik bakteri endofit yang diidentifikasi sama, sebaliknya kalau jumlah dan ukuran pita DNA-nya berbeda (polimorfik) maka secara genetik bakteri endofit yang diidentifikasi berbeda. Berdasarkan pola pita DNA yang dihasilkan, ternyata dari primer pertama terlihat bahwa tiap sampel memiliki panjang basa yang berbeda.

Sampel Umbi 1 menunjukkan pola pita yang berbeda dengan yang lain yaitu 3 pita DNA, dimulai dari ukuran panjang basa 1000-1500bp. Sedangkan pada umbi 2 hanya muncul pita pada panjang basa 1200bp, begitu pula dengan Umbi 3 dan Umbi 4 yang masing-masing muncul pada 1300bp (Umbi 3) dan 1100bp (Umbi 4). Untuk Umbi 5 dan Umbi 6 muncul pita DNA dengan panjang pita yang sama yaitu 1300bp. Jadi bisa dikatakan Umbi 3, Umbi 5 dan Umbi 6 merupakan bakteri endofit yang sejenis, berdasarkan pola pita RAPDnya.

Penanda RAPD yang ditemukan, ternyata dapat membedakan bakteri endofit dari 6 sampel, tanpa tahu terlebih dahulu spesiesnya. Hasil yang serupa ditemukan juga pada bakteri patogen, serta bakteri penghasil asam laktat. Yakni penanda RAPD dapat membedakan antar-varietas koleksi plasma nutfah bakteri-bakteri tersebut di China (Yamaguchi, 1998). Pada tanaman kapas penanda RAPD dapat juga mengelompokkan kultivar kapas yang diploid dan kultivar kapas tetraploid (Rana and Bhat, 2005).

Keterangan
Gambar:

M = Marker
U1 = Umbi 1
U2 = Umbi 2
U3 = Umbi 3
U4 = Umbi 4
U5 = Umbi 5
U6 = Umbi 6
K = Kontrol



Gambar 4.8 Elektroforesis Hasil PCR (sesudah PCR Primer Umum)

Gambar 4.8 menunjukkan hasil yang berbeda. Dari 6 sampel yang di PCR pertama, semua sampel yang telah teramplifikasi saat di PCR, menunjukkan panjang basa yang sama. Ini menunjukkan bahwa kecocokkan primer umum baik, namun tidak melebihi hasil dari primer pertama. Selain itu panjang basa yang dihasilkan dari primer umum hanya berkisar 800bp. Hasil ini bisa saja dipengaruhi oleh tingginya suhu, atau primer yang tidak bisa membaca amplifikasi DNA bakteri endofit lebih dari 800bp.

Primer kedua yang digunakan menunjukkan hasil pada gambar 4.8 dengan pola pita DNA yang sama tiap sampel. Jadi 6 sampel bakteri endofit tersebut bisa dikatakan sejenis atau tidak ada perbedaan sama sekali. Namun panjang basa yang terbaca hanya berkisar 800bp saja. Sedangkan yang diperlukan dalam kebutuhan sequencing untuk bakteri endofit ini antara 1000bp-1500bp. Maka dapat disimpulkan bahwa primer ini kurang spesifik untuk PCR hasil DNA bakteri endofit. Tidak hanya itu, bahkan dapat disimpulkan juga bahwa bakteri endofit yang di isolasi tidak terdapat perbedaan dengan primer umum.

Dari dua primer yang digunakan yaitu primer (27F, 1492R) dan umum (785F, 802R) menunjukkan fragmen DNA yang bervariasi untuk masing-masing sampel. Variasi fragmen DNA dapat dilihat dari perbedaan jumlah total pita, ukuran fragmen. Variasi tersebut dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.2 Jumlah dan Ukuran Fragmen DNA bakteri endofit

Primer	Jumlah Fragmen	Panjang Fragmen
khusus (27F, 1492R)	1-3 fragmen / sampel	1000bp-1200bp
umum (785F, 802R)	1 fragmen / sampel	800bp

Dari hasil tabel 4.3 menunjukkan bahwa jumlah fragmen DNA yang dihasilkan lebih baik dari primer pertama. Dimana jumlah fragmen DNA yang dihasilkan persampel antara 1-3 fragmen. Ini menunjukkan bahwa primer tersebut cukup bagus digunakan untuk analisis RAPD atau tingkat selanjutnya (*sequencing*).

Sesuai pernyataan Soewardi (2007) bahwa untuk keperluan analisis, semakin tinggi pita yang dihasilkan suatu primer, semakin baik untuk direkomendasikan untuk keperluan analisis. Fragmen yang sering ditemukan pada hasil PCR-RAPD berkisar antara 200-5000 bp.

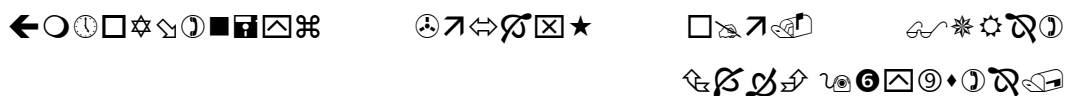
Keberhasilan amplifikasi genom sangat dipengaruhi oleh urutan nukleotida primer. Dimana primer yang memiliki kesesuaian urutan nukleotidanya dengan genom menghasilkan amplifikasi fragmen DNA dalam jumlah tertentu (Dinesh at al, 1994).

Hal ini didukung oleh pernyataan (Tingey at al (1992) yang menyatakan bahwa keberhasilan suatu primer mengamplifikasi DNA cetakan ditentukan oleh ada tidaknya homologi sekuens nukleotida primer dengan DNA cetakan. Selain

itu, pada kolom yang memiliki fragmen DNA yang jelas terlihat menunjukkan pola yang bervariasi antar primer, mengindikasikan spesifitas sekuen DNA tempat masing-masing primer tersebut melekat.

Dari hasil amplifikasi menunjukkan bahwa primer yang digunakan cukup bagus untuk keperluan analisis RAPD, dimana menurut Suwardi (2007) bahwa untuk keperluan analisis, semakin tinggi pita yang dihasilkan suatu primer, semakin baik untuk direkomendasikan untuk keperluan analisis.

Perbedaan selalu ada dalam hal apapun, termasuk bakteri endofit yang ada pada umbi tanaman kentang. Allah menciptakan makhluknya berbeda-beda agar dapat saling melengkapi, dan saling bekerja sama dalam hal apapun. Bakteri endofit yang berasal dari umbi kentang memiliki ukuran yang sangat kecil, bahkan bisa dikatakan ukuran mikro. Namun manfaatnya bagi manusia sangat besar, bahkan dalam bidang pertanian. Sesuai dengan firman Allah SWT dalam surat Al-Qamar, ayat 49 berbunyi ;



Artinya; Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.

Allah yang menciptakan segala yang ada dan Allah juga yang menentukan kadar ciptaan-Nya. Dengan ketentuan kadar masing-masing inilah Allah membuat variasi atas ciptaan-Nya sehingga tercipta makhluk dengan keadaan, karakter dan fungsi masing-masing (Kusnadi, 2007)

Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman (xylem dan floem),

daun, akar, buah, dan batang (Tanaka dkk, 1999 dalam Simarmata, 2007). Mikroba ini hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (genetic racombination) dari 30tanaman inangnya ke dalammikroba endofit (Tan RX dkk, 2001 dalam Radji, 2005).

BAB V

P E N U T U P

5.1 Kesimpulan

Dari hasil pembahasan maka didapat kesimpulan sebagai berikut;

1. Hasil isolasi bakteri endofit dari umbi tanaman kentang mendapatkan 6 isolat bakteri endofit (U1, U2, U3, U4, U5, U6). Pengamatan morfologi yang dilakukan mendapatkan Keenam isolat bakteri endofit yang mempunyai karakterisasi bervariasi baik dalam morfologi maupun sifat pewarnaan. Bentuk koloni isolat didominasi oleh *Irregular* (bulat tidak rata), dengan bentuk tipe yang bervariasi. Elevasi koloni terdiri 2 yakni *Umbonate* (cembung tambahan) dan *convex* (cembung), Sedangkan pewarnaan gram sel bakteri diperoleh isolat bersifat gram negatif dengan bentuk koloni didominasi oleh *bacillus*.
2. Karakteristik molekuler bakteri endofit yang dilihat dari pola pita DNA hasil PCR-RAPD menunjukkan panjang basa yang berbeda. Pada penggunaan primer khusus pola pita DNA bakteri endofit berkisar antara 1000bp-1200bp. Namun pada penggunaan primer umum pola pita DNA bakteri endofit berkisar antara 900bp. Perbedaan yang terdapat pada pola pita kedua primer tersebut adalah, munculnya beberapa pita pada U1 saat menggunakan primer khusus. Sedangkan pada primer umum hanya 1 pita DNA saja. Begitu pula pada U5 dan U6, yang muncul doubleband dengan panjang basa yang sama. Namun pada penggunaan primer umum tidak.

5.2 Saran

Penggunaan primer yang umum (785F, 802R) digunakan untuk semua bakteri belum tentu pas digunakan untuk bakteri endofit. Ditakutkan pada saat penggunaan sampel untuk sequencing hasil yang diharapkan kurang memuaskan. Maka dari itu adanya primer khusus (27F, 1492R) ini membantu dalam analisis biomolekuler selanjutnya. Primer khusus ini juga membantu dalam identifikasi bakteri endofit yang bisa saja dilanjutkan pada tingkat kekerabatannya dengan melihat dan membaca hasil siquen yang dihasilkan oleh bakteri endofit tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Aryantha, N. P., Lestari, D. P dan Pangesti, N. P. D. 2005. Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA dalam Peningkatan Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau pada Kondisi Hidroponik. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. Vol. 9, No. 2
- Bardacki, F. and D. O. F. Skibinski. 1994. *Application of the RAPD Technique in Tilapia Fish : Species and Subspecies Identification* . Heredity 73.
- Beukema, H.P. 1977. *Potato production*. International Agriculture Centre, Wageningen.
- BPPHP. 2004. *Manfaat Kentang bagi Kesehatan*. Buletin Teknopro Hortikultura. Direktorat Pengolahan dan Pemasaran Hasil Hortikultura.
- Buckle, K. A., Edward, R. A., Flet, G. H., dan Wootton, M. 1985. *Ilmu Pangan. Terjemahan Adiono dan Purnomo, H.* Jakarta: UI-Press.
- Chakrabarti, P., B.K dan A. Kapil. 2009. Application Of 16S Rdna Based Seminestead PCR For Diagnosis of Acute Bacterial Meningitis. *Indian J med Res* **129**: 182-188
- Clay, K. 1991. *Fungal endophytes of grasses: A Deversive Mutualism Between Plants and Fungi*. Ecology 69 (1): 10-16
- Departemen Perlindungan Tanaman. 2008. *Pengenalan dan Pengendalian NSK (Nematoda Sista Kuning)*. <http://ditlin.hortikultura.deptan.go.id>. Diakses Tanggal 13 April 2012.
- Dinesh, K.R., V.P.E. phang, T.M. Lim, K.L. Chua, and T.W. Tan. 1996. Genetic Variation Inferred from RAPD Fingerprinting in Three Species of Tilapia. *Journal Aquaculture International* 4:19-30
- Ditlin. 2008. Pengenalan dan Pengendalian NSK (Nematoda Sista Kuning). http://ditlin.hortikultura.deptan.go.id/makalah/nsk_kentang.html. Akses 7 Maret 2012.
- Elavanzhagan, T., S. Jayakumar, V. Balkrishnan dan C. Chitravadivu. 2009. *Isolation Of endophytic bacteria from the invasive alien weed, Mikania micrantha and their molecular characterization*. American-Eurasian Journal of Scientific Research **4(3)** : 154-158.
- Ewing, E.E., and R.E. Keller. 1982. *Limiting factors to the extension of potato into non-traditional climates*. p. 37-40. Proc. Int. Congr. Research for the Potato in the Year 2000. International Potato Centre.
- Fricker, M., U. Messelhaüßer, U. Busch, S. Scherer, and M. Ehling-Schulz. 2007. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 6. Mar. 2007, P. 1892–1898.

- Gembong, T. 1994. *Taksonomi Tumbuhan Obat-Obatan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Ghoffar, M.A. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir, Jilid 7*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Hallmann J, 2001. *Endophytic rhizobacteria as antagonists of Meloidogyne incognita*. On Cucumbr
- Harni, P.Q., dan K. Annapurna. 2004. *Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (Glicine sp.)*. Omonrice **12** : 92-101
- Hawkes, J.G. 1992. History of the potato. p.1-12. In: P.M Harris (ed.). The potato crop. *The scientific basis for improvement*. Chapman and Hall, London.
- Juwita, 2010. *Potensi Bakteri Endofit Dalam Meningkatkan Ketahanan Tanaman Kentang (Solanum tuberosum) terhadap Serangan Nematoda Sista Kuning (Globodera rostochinensis)*. Skripsi. Malang: UIN-Malang
- Kloepper JW, Rodriguez-Kabana R, McInroy JA, Young RW. 1992. Rhizosphere bacteria antagonists to soybean cyst (Heterodera glycines) and root knot (Meloidogyne incognita) nematodes: identification by fatty acid analysis and foliar diseases. *Australasian Plant Pathol* 28:21-26.
- Kusnadi. 2007. *Akidah Islam Dalam Konteks Ilmiah Populer*. Jakarta: Amzah.
- Lane, R. and P.R. Reeves. 1991. *Gen transfer is the major factor in bacterial evolution*. Molecular Biology Evolution 13: 47-55.
- Lisnawita. 2003. *Penggunaan Tanaman Resisten Suatu Strategi Pengendalian Nematoda Parasit Tanaman*. USU Digital Library
- Long, H.H., N. Furuya,. D. Kurose, m. Takeshita, dan Y. Takanami. 2003. Isolation of Edophytic bacteria from Solanum sp. and their antibacterial activity against plant phatogenic bacteria. *L. Fac. Agr., Kyushu Univ., 48 (1-2) : 21-28*
- Madigan, M. T dan Martinko, J. M. 2006. *Biology of Microorganism. Eleventh Edition*. Pearson Prentice Hall. American
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin and J.C. Fry et al., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environ. Microbiol.* 64: 795-799.
- Millipore, 2006. *Pengumpulan Sampel, Ekstraksi DNA, dan Kuantifikasi DNA* (<http://www.freewebs.com/pengumpulansampeldna/index.htm>). Diakses 11 januari 2012.
- Nugroho, D. 2004. Eksplorasi Bakteri Endofit Pada AkarTanaman Kentang Yang Berpotensi Sebagai Antagonis Pseudomonas solanacearum. *Jurusan Hama*

dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Tidak Diterbitkan.

- Nurhidayah, Sari, M. dan Yuliati, P. 2005. *Kandungan Klorofil pada Daun Tanaman Kentang (Solanum tuberosum L.) di Sekitar Kawah Sikidang Dataran Tinggi Dieng*. Biosmart Vol. 3, No. 1. <http://www.scribd.com/doc/13095034/b030107>. Akses pada 13 januari 2012.
- Olivares James FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Dobereiner J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of gramineae. *Biol Fertil Soils* 21:197-200.
- Pelczar, Michael J dan Chan, E.S.C. 1984. *Dasar-Dasar Mikrobiologi. Edisi 1. Terjemahan Ratna Siri H, Teja Imas, S. Sutarmi dan Sri Lestari A.* Jakarta: UI-Press.
- Permadi, A.H. 1989. *Asal-Usul dan Penyebaran Kentang*. Balai Penelitian Hortikultura, Lembang.
- Pitojo, S. 2008. *Penangkaran Benih Kentang*. Yogyakarta : Penerbit KANISIUS
- Prihatiningtias, Widyati. 2006. *Mikroba Endofit, Sumber Penghasil Antibiotik yang Potensial. Fakultas Farmasi UGM*. http://dianing.blogspot.com/2006_05_01_archive.html. Diakses pada 20 Juli 2012
- Qaradhwai, Al. Y. 2001. *Islam Agama Ranah Lingkungan*. Jakarta Timur: Pustaka Al-Kautsar.
- Qur'anul Karim
- Quthb, S. 2004. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an jilid X Ed. Super Lux*. Jakarta: Gema Insani Press.
- Radji, Maksum. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Laboratorium Mikrobiologi dan Depok. 113 – 126. Departemen Farmasi, FMIPA-UI, Kampus UI Depok 16424 Majalah Ilmu Kefarmasian, , No.3, Desember 2005, 113 – 126*
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. II, No. 3. Hal: 113-126.*
- Rubatzky, V. E. dan Yamaguchi, Mas. 1998. *Sayuran Dunia 1: Prinsip, produksi dan Gizi Edisi Kedua*. Bandung: ITB Bandung. Penerjemah Ir.Catur Herison MSc., Universitas Bengkulu.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch 7 T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual, Ed ke-2*. Cold Spring Harbor laboratory Press, USA

- Setiyono, D. 2011. Biosintesis Polihidroksialkanoat oleh Bakteri gamma Protoebacterium WD-3 dari Asam Lemak Volatil. *Jurnal "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by gamma proteobacterium WD-3 from volatile fatty acids" ITS*. **44** : 21-23
- Shiddieqy, As. Tengku Muhammad Hasbi. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Jilid 2. Semarang: PT. Pustaka Rizki Putra
- Soehardjo, Indrayana Noto. 2003. *PCMV-b-Gal Sebagai Bahan Baku Pembuatan Marker DNA yang Mudah dan Murah*. (<http://www.adln.lib.unair.ac.id/>). Diakses 24 Januari 2012.
- Soewardi, K. 2007. *Pengelolaan Keragaman Genetik Makhluk Hidup*. Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Strobel G.A., R.V. Miller, C.Miller, M. Condrón, D.B. Teplow, and W.M. Hess. 1999. *Cryptocandin, a potent antimycotic from endophytic fungus Cryptosporiopsis quercina*. *Microbiology* 145: pp.1919-1926.
- Strobel, G.A. 2002. *Microbial Gifts From Rainforests*. *Can. J. Plant Pathology*. 24:14-20
- Sturz, Antony V. 2006. *Bacterial Root Zone Communities, Beneficial Allelopathies and Plant Disease Control in Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases*. Netherlands. Published by Springer.
- Suryani, Y. 2001. *Ekspresi Heterologus Gen Interferon alfa 2 Manusia : isolasi, Kloning, dan Sekuensing*. Bandung ; 13-16
- Suryanto, D. & A. Suwanto. 2001. *Characterization of three benzoate degrading anoxygenic photosynthetic bacteria isolated from the environment*. *Biotropia* 17: 9-17.
- Suryanto, D. 2001. *Selection and characterization of bacterial isolates for monocyclic aromatic degradation*. Disertasi. IPB Bogor. \
- Suwarno, W. B. 2008. *Sistem Pembenihan Kentang Indonesia*. <http://www.situshijau.co.id>. Diakses tanggal 13 April 2012
- Syarmalina. 2008. *Endifit dan Pelestarian Alam*. PT. ISFI Medisina Edisi 2/ vol 1/ April-Juni 2007. Diakses 26 Juni 2012.
- Tan, R.X and W.X Zou. 2001. *Endophytes a rich source of functional metabolites*. *Nat prod. Rep.*18: 448-459.
- Tannock GW. 2004. *Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria*. *Current Issues Molec Biol* 1: 53-64.
- Tingey, S.V., J.A. Rafalski and J.G.K. Williams, 1992. *Genetic Analysis With RAPD Markers. Symposium of the Application of RAPD Technology*

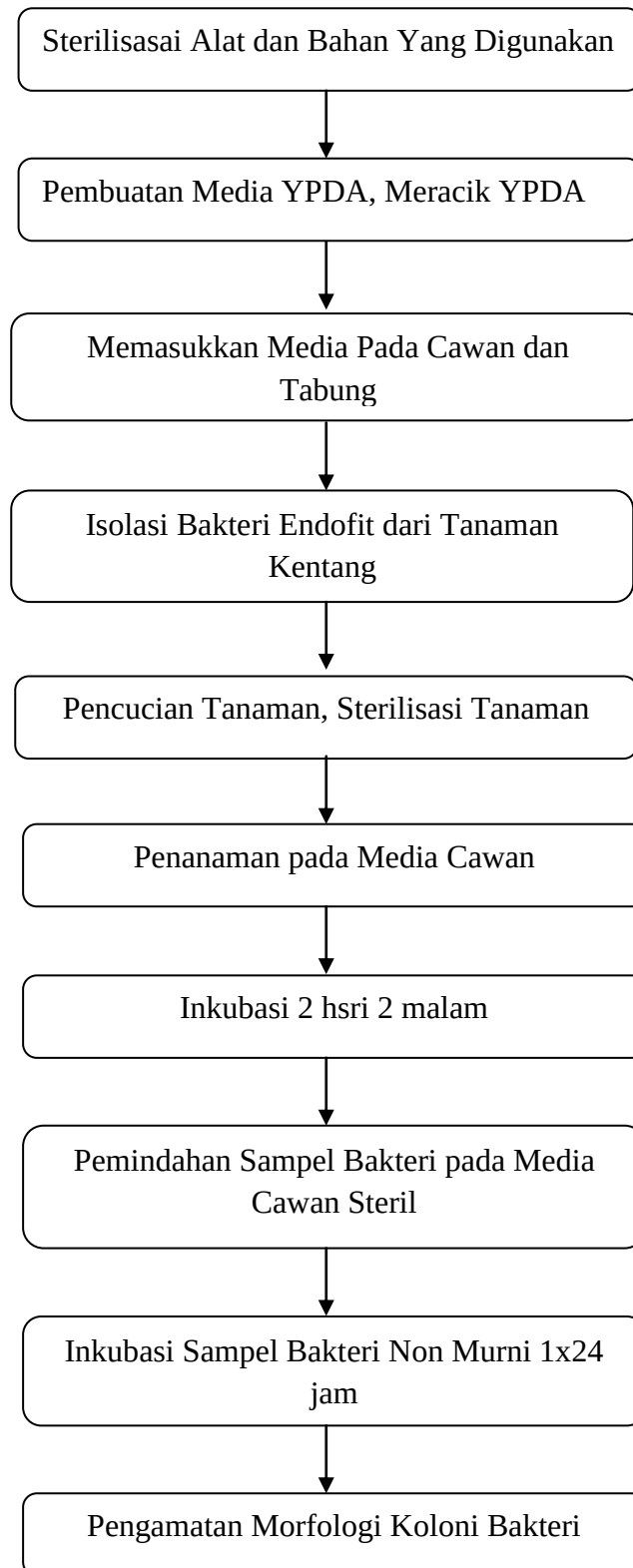
to *Pant Breeding*. *Joint Plant Breeding Symposium Series*, 1 November 1992. Minneapolis, Minnesto.

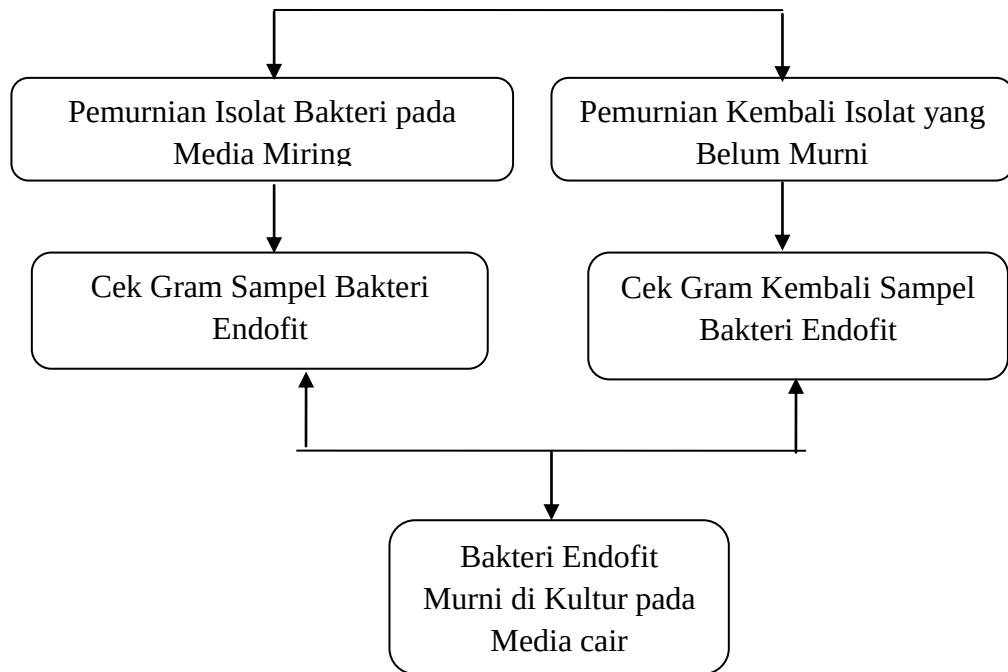
Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N. Massjik, E. Syamsudin, Ni Made A Wiendi A., dan Ernawati. 1991. *Bioteknologi tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Williamson. V.M & Richard. S.H. 1996. Nematode pathogenesis and Resistance in Plant. *The Plant Cell*. 8 : 1735-1745.
<http://plantpath.caes.uga.edu/personnel/faculty/documents/Plantcell.pdf>.
 Akses 20 Juli 2012.

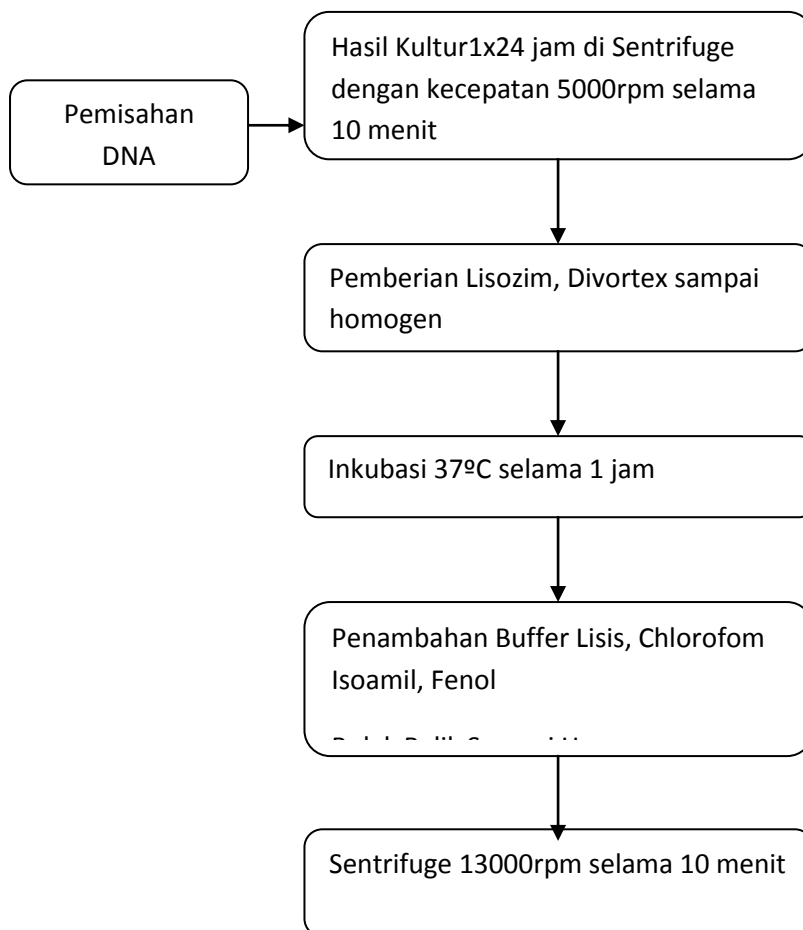
Yunus, A., Ichinose, Y., Shiraishi, T and Yamada, T. 1999. *Genetic modification of Mutualistic Fungal Acremonium Endophyte*. Scientific Journal of the Faculty of Agriculture, Okayama University, Japan. Vol. 87:99-107

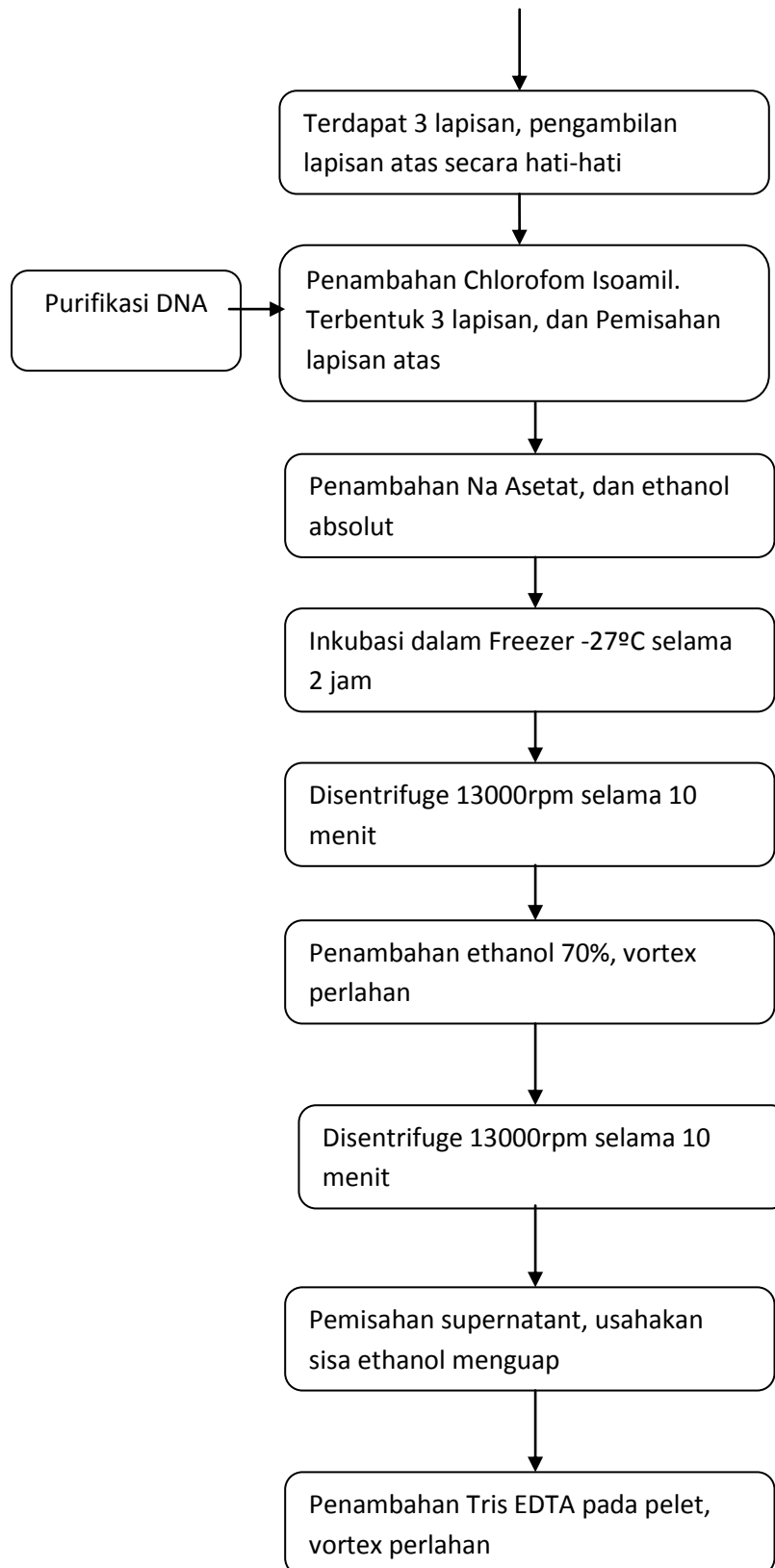
Zinniel, D., P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmarski, P. Higley, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta, dan A.K. Vidaver. 2002. *Isolation and characterization of endoptphytic colonizing bacteria from agronomic crops and Praire aplants*. *App. Environ Mikrobiol*. May; **68(5)**: 2198-2208.

LAMPIRAN 1**1. Flow Chart Isolasi Bakteri Endofit**

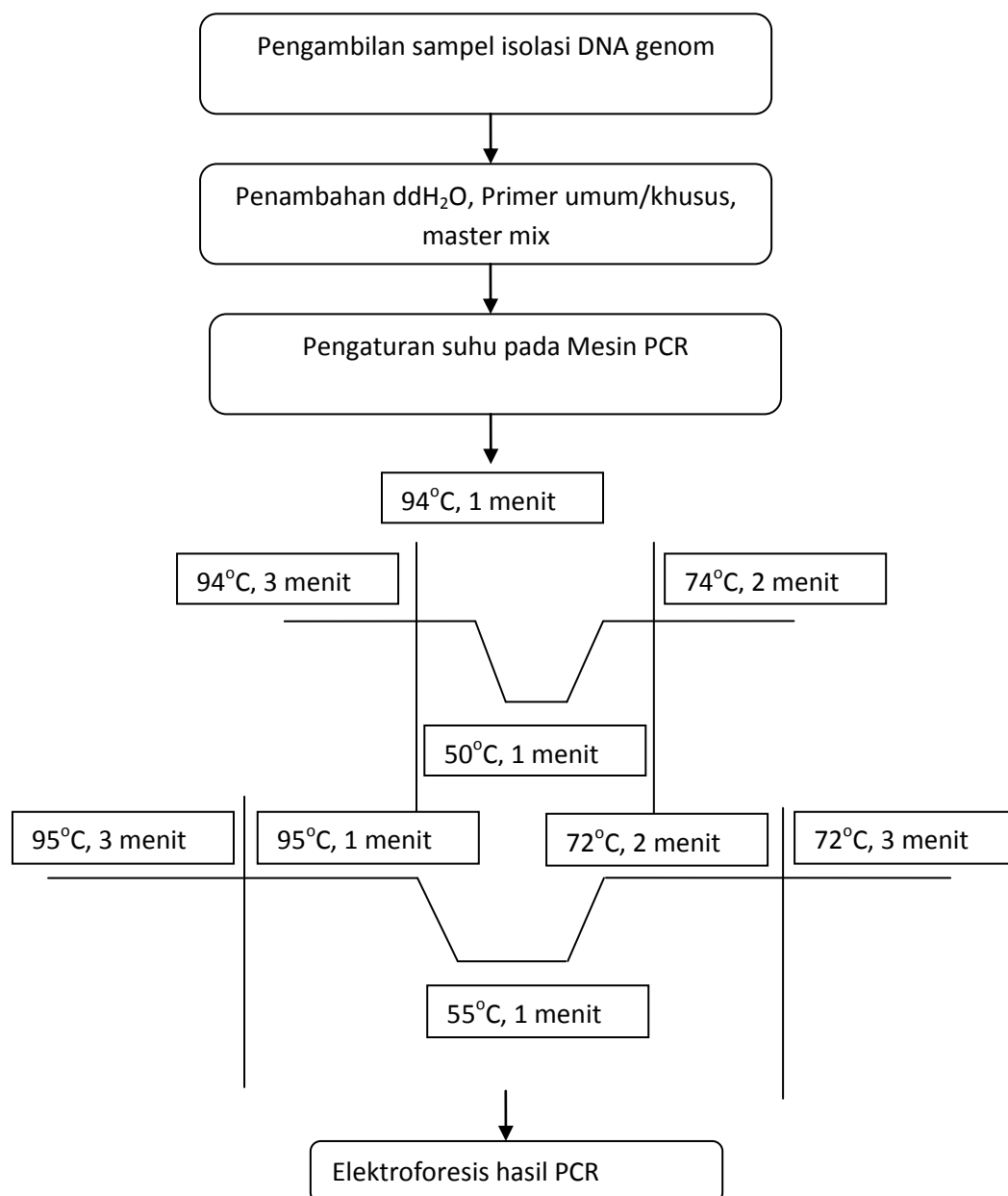


2. Flow Chart Isolasi DNA Bakteri Endofit

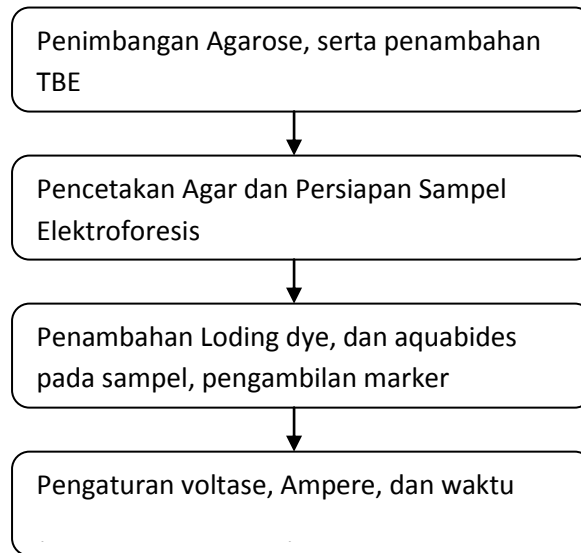




3. Flow Chart PCR



4. Flow Chart Elektroforesis

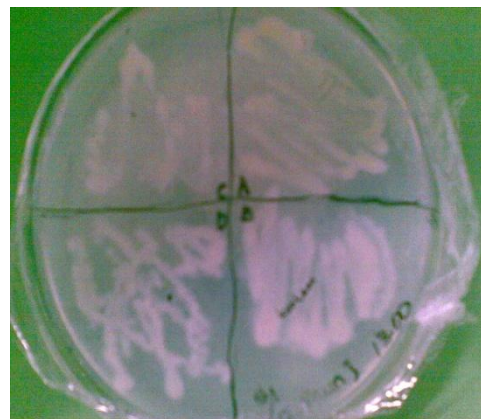
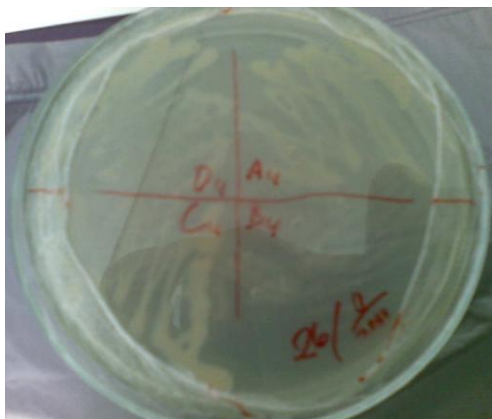


LAMPIRAN 2

1. Dokumentasi Hasil Penelitian

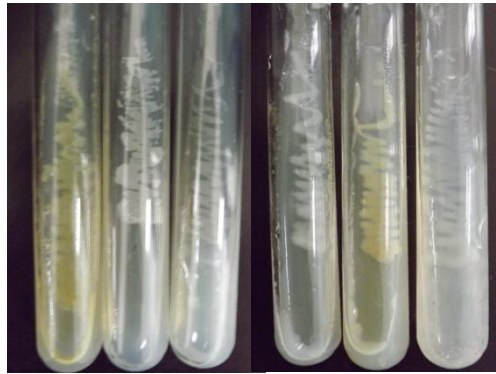


a. Gambar Isolasi bakteri Endofit dari Umbi Tanaman Kentang



b. Gambar Isolat Bakteri Endofit Non Murni pada Media YPDA cawan

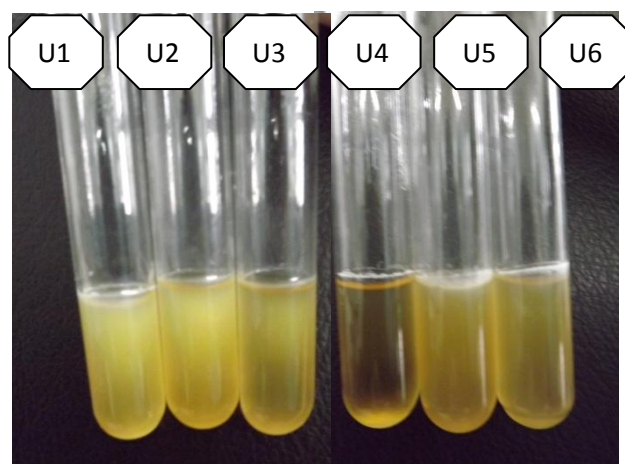
c. Gambar Isolat Bakteri Endofit Murni Pertama pada Media Miring YPDA



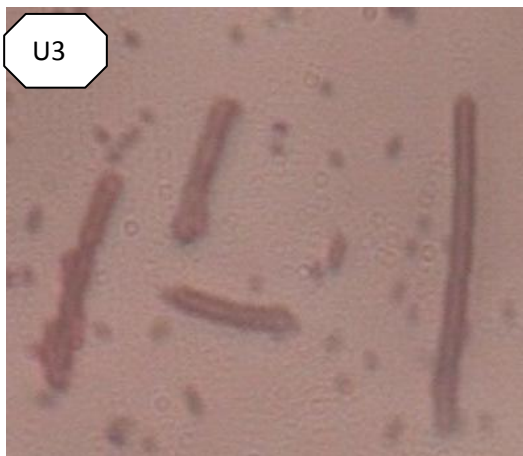
d. Gambar Isolat Bakteri Endofit Murni Kedua pada Media Miring YPDA



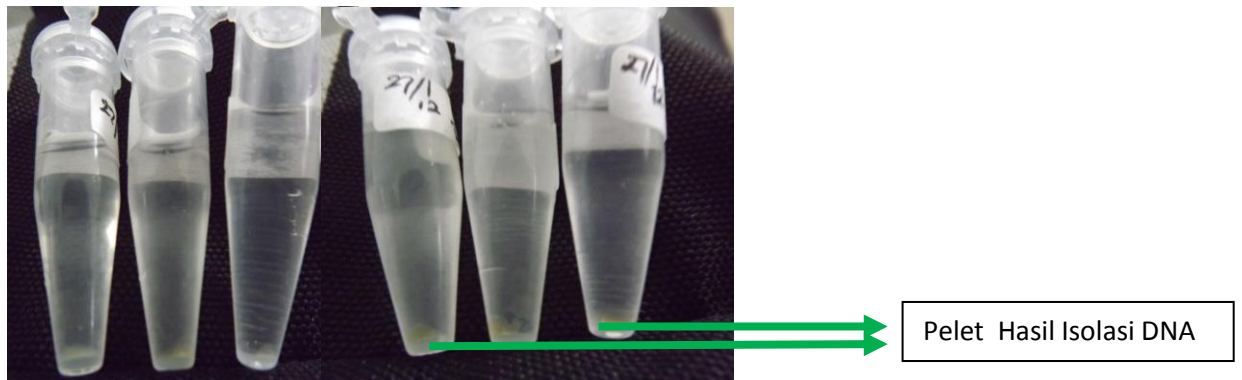
e. Gambar Hasil Kultur Bakteri Endofit



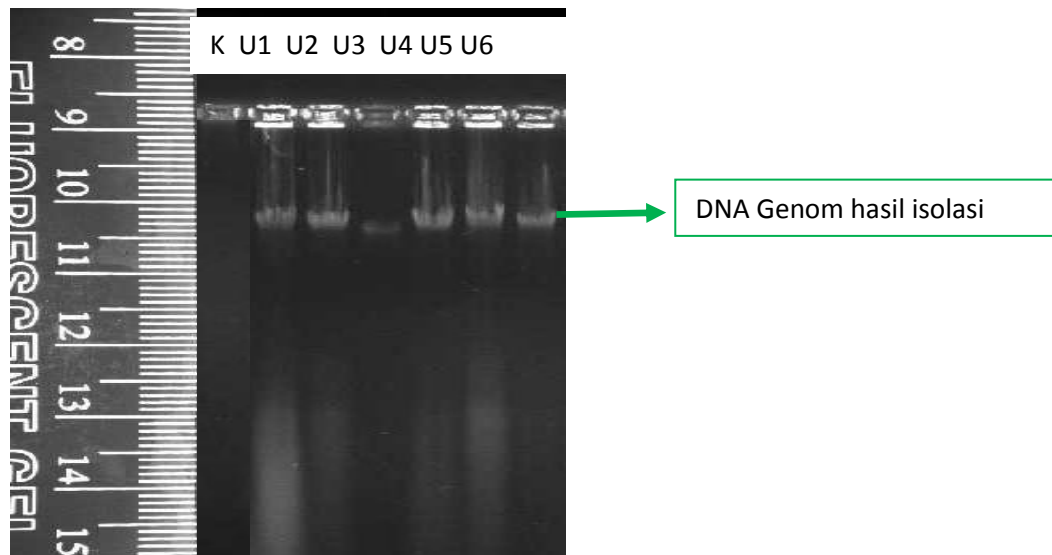
f. Gambar Cek Gram pada Bakteri Endofit



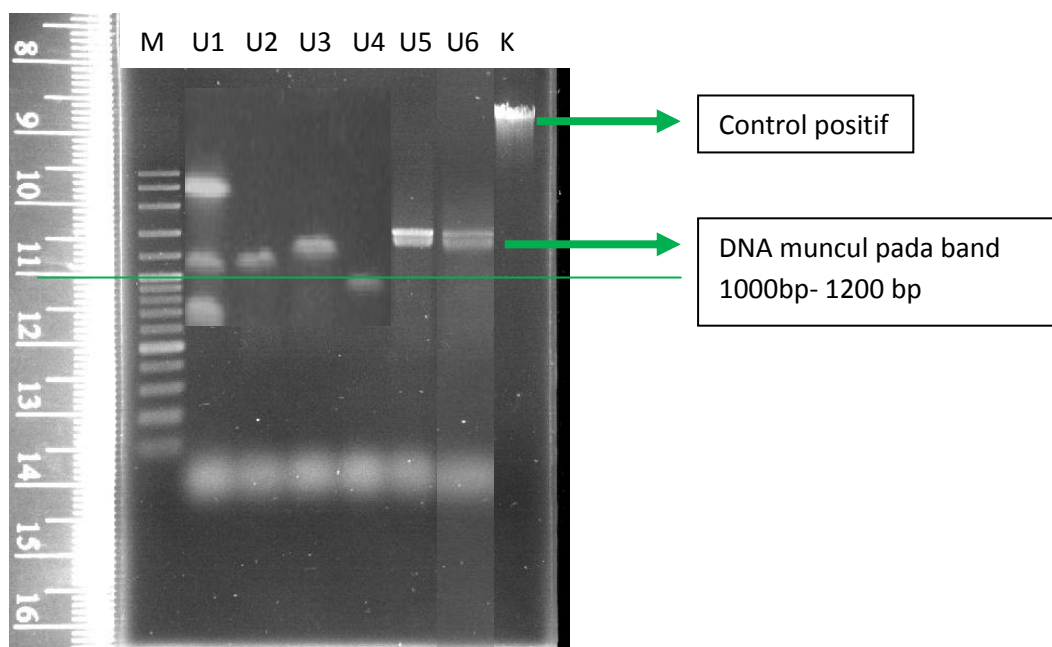
g. Gambar Hasil Isolasi DNA Bakteri Endofit



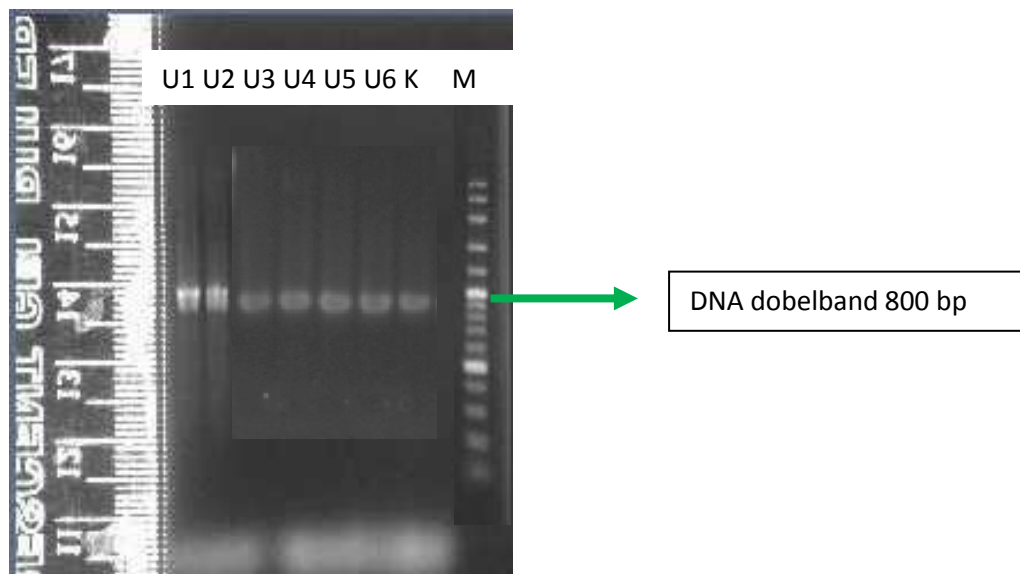
h. Gambar Hasil Elektroforesis DNA Genom



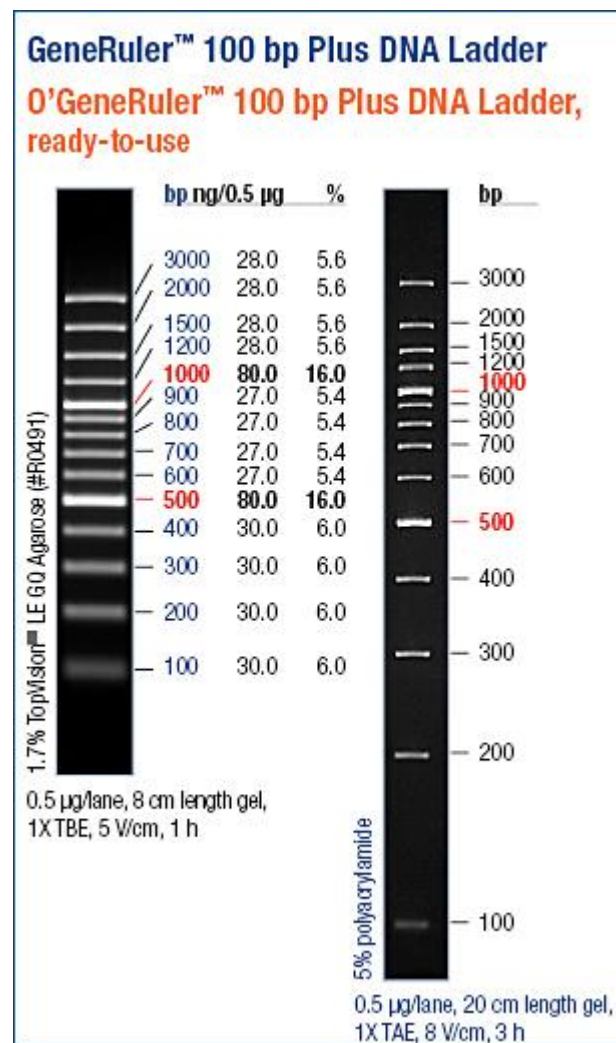
i. Gambar Hasil Elektroforesis PCR dengan Primer Khusus



j. Gambar Hasil Elektroforesis PCR dengan Primer Umum



k. Ketentuan Pita Marker 100bp untuk Elektroforesis



3. Dokumentasi Alat dan Bahan



a.



b.



c.



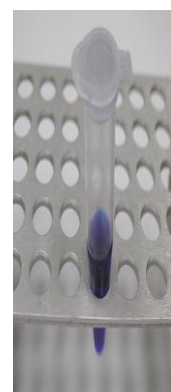
d.

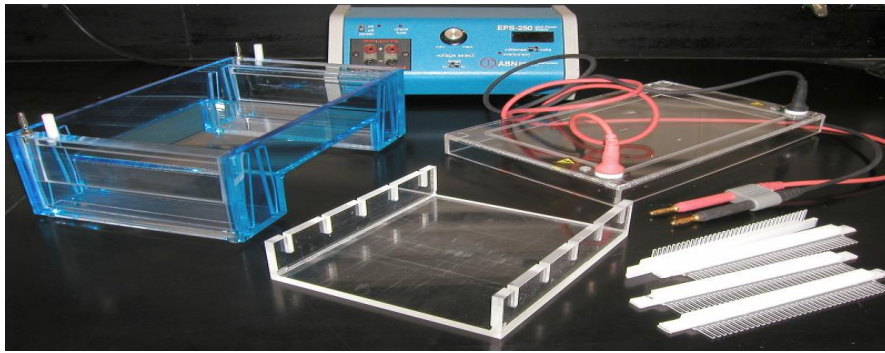


e.

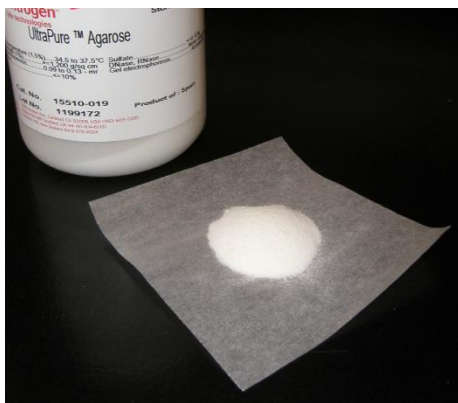


f.





g.



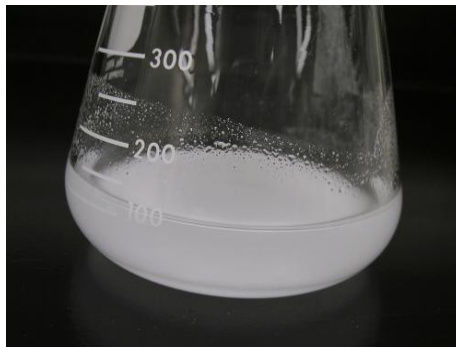
h.



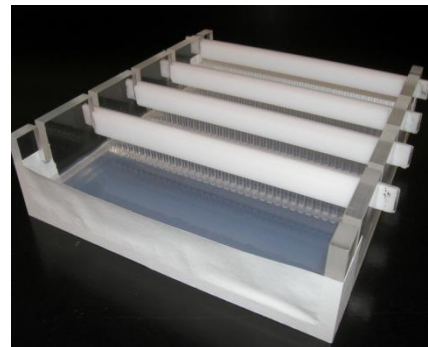
i.



j.



k.



l.



m.



n.



o.

Keterangan :

- | | | | | |
|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|--------------|
| a. Autoklaf | b. Hot Plate | c. LAF | d. Alat-alat Gelas | e. bahan PCR |
| f. Loading dye, marker | | g. Alat Elektroforesis | | h. agarose |
| i. Penuangan agar | j. Penambahan TBE | | k. Pemanasan agar + TBE | |
| l. Pencetakan Gel | m. ETBR | n. Perendaman ETBR | | o. Gel Doc |



DEPARTEMEN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

Jl. Gajayana 50 Malang Telp. (0341) 551354 Fax. (0341) 572533

BUKTI KONSULTASI

Nama : Aan Rosita
 NIM : 08620016
 Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi
 Pembimbing : Ir. Lilik Hariani, AR. M.P
 Judul : Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Dari Umbi
 Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Menggunakan
 Primer PCR-RAPD

No	Tanggal	Hal yang dikonsultasikan	Tanda tangan
1.	28 Februari 2012	Pengajuan Bab I, II, III	
2.	29 Februari 2012	Revisi Bab I, II, III	
3.	7 Maret 2012	Revisi Bab I, II, III	
4.	10 Maret 2012	Acc Bab I, II, III	
5.	13 Maret 2012	Seminar Proposal	
6.	27 Agustus 2012	Pengajuan Bab IV dan V	
7.	28 Agustus 2012	Revisi Bab IV dan V	
8.	2 September 2012	Acc Bab IV dan V	

Mengetahui :

Ketua Jurusan Biologi ,

Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd

NIP. 19630114 199903 1 001

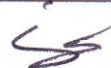


DEPARTEMEN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

Jl. Gajayana 50 Malang Telp. (0341) 551354 Fax. (0341) 572533

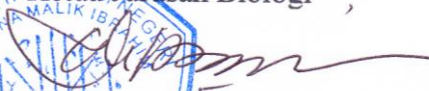
BUKTI KONSULTASI

Nama : Aan Rosita
 NIM : 08620016
 Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi
 Pembimbing : Moch. Imammudin, M.A
 Judul : Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Dari Umbi
 Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Menggunakan
 Primer PCR-RAPD

No	Tanggal	Hal yang dikonsultasikan	Tanda tangan
1.	29 Juni 2012	Pengajuan Bab I, II, III	
2.	13 Juli 2012	Revisi Bab I, II, III,	
3.	13 Juli 2012	Pengajuan Bab IV dan Bab V	
4.	19 Juli 2012	Revisi Bab IV dan Bab V	
5.	2 September 2012	Acc Keseluruhan	

Mengetahui :

Ketua Jurusan Biologi


Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd
 NIP. 19630114 199903 1 001