

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 Sel
	Morfologi Koloni			Gram	Bentuk	
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna		
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)

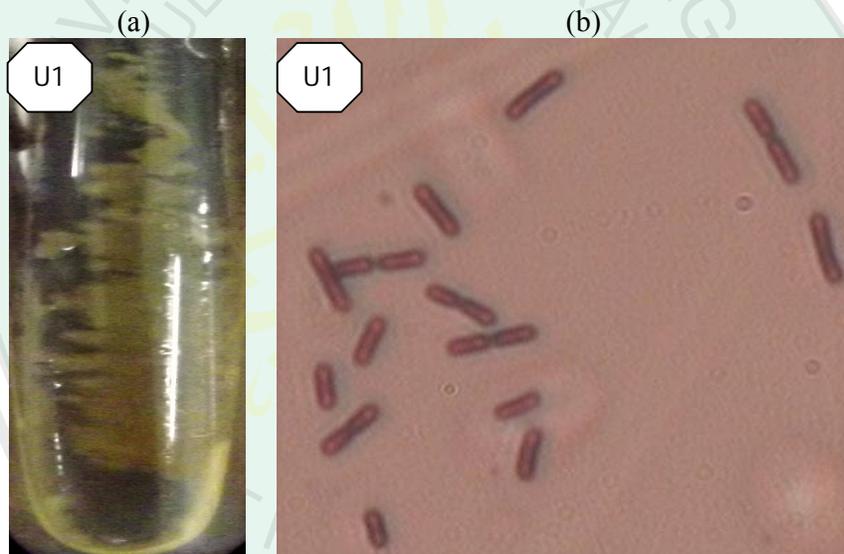
Pengamatan gram (+) dan gram (-) pada isolat umbi menunjukkan bahwa. Bakteri endofit pada isolat (1, 2, 3, 4, 5 dan 6) merupakan bakteri gram (-) dengan bentuk *bacillus*. Dikatakan gram negatif karna terdapat sisa *Safranin* yang mewarnai sel bakteri maka menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif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

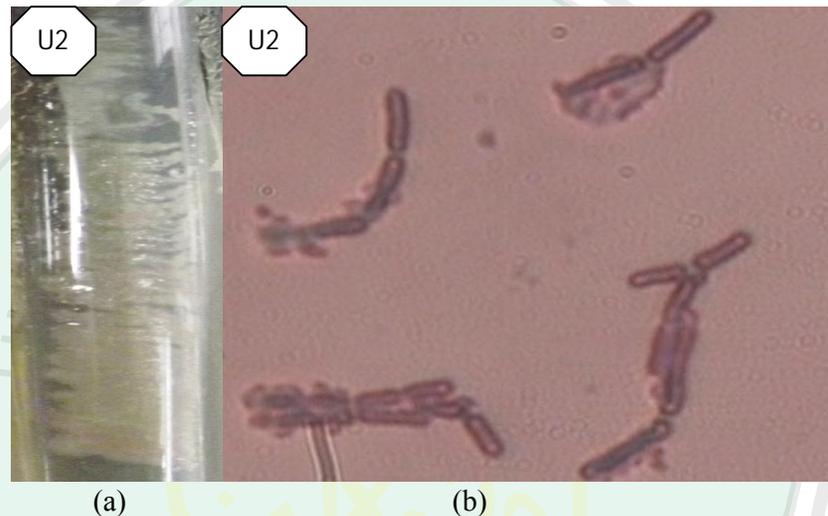


Gambar 4.1 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U1 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik

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)

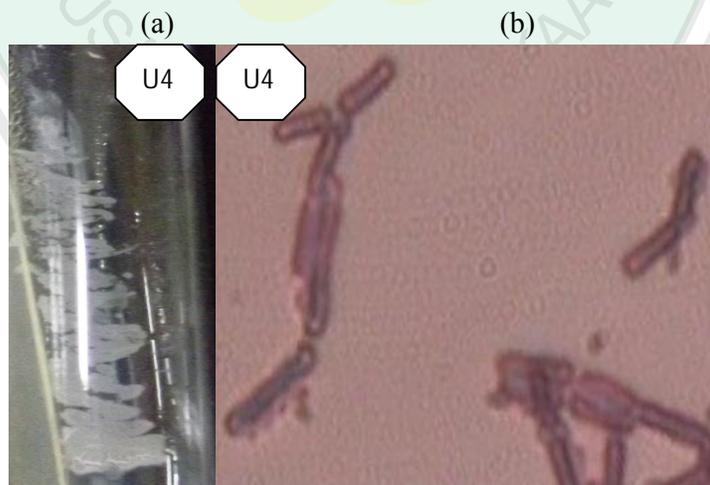
Isolat U3 memiliki koloni yang mengeluarkan pigmen berwarna putih susu pekat pada medium YPDA, dan memiliki bentuk koloni tidak beraturan, dengan sudut yang tidak cembung dan tepi yang tidak rata juga. Bentuk sel bakteri berbentuk batang. Koloni bakteri endofit dengan kode U3, secara makroskopis bentuk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

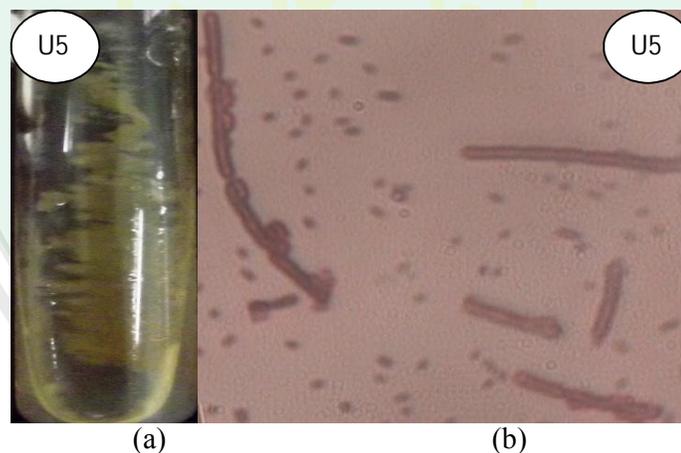


Gambar 4.4 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U4 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit Secara Mikroskopik

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;

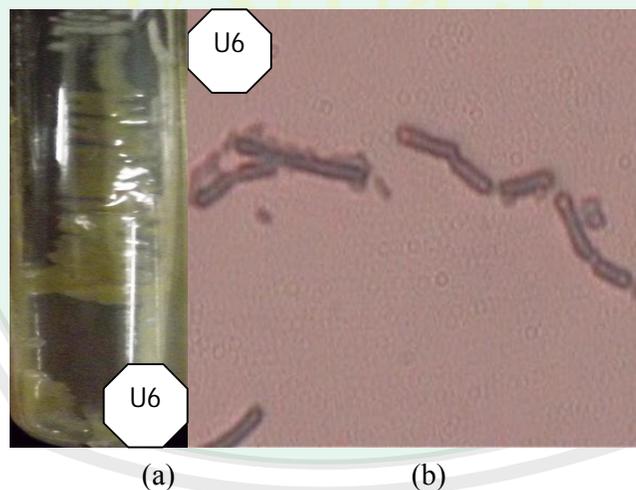


Gambar 4.5 (a) Pertumbuhan Koloni Bakteri Endofit dengan Kode Isolat U5 pada Medium YPDA, (b) Bentuk Sel Bakteri Endofit (U5) Secara Mikroskopik

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

عن أبي هريرة قال : قال رسول الله صلى الله عليه وسلم إذا وقع الدُّبَابُ فِي شَرَابٍ أَحَدِكُمْ
فَلْيَغْمِسْهُ ثُمَّ لِيَنْزِعْهُ فَإِنَّ فِي أَحَدِ جَنَاحَيْهِ دَاءٌ وَفِي الْأُخْرَى سِقَاءٌ (أَخْرَجَهُ بَخَارِي)

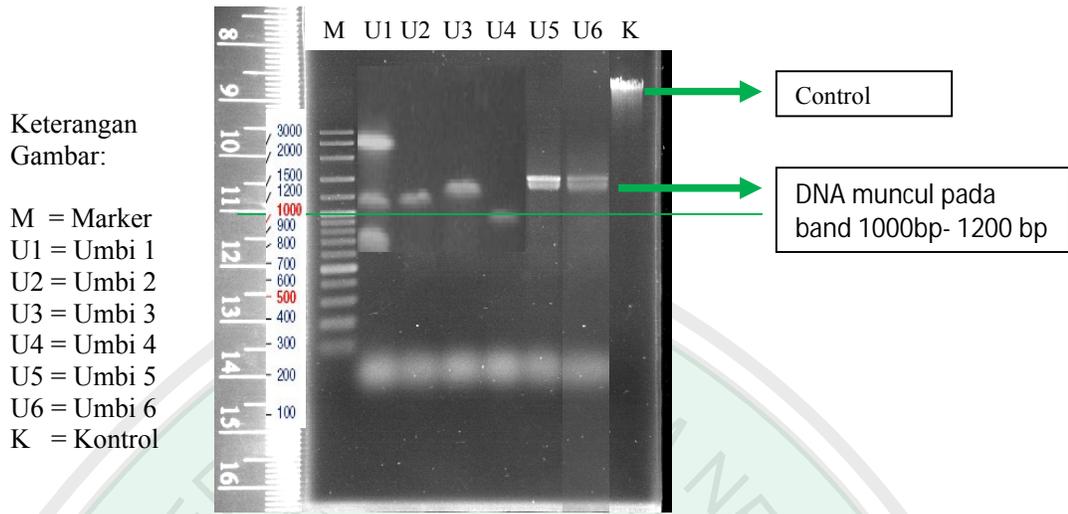
Artinya: Dari abu hurairah berkata, Rasulullah SAW bersabda: “Bila ada lalat yang jatuh di dalam minuman salah satu di antara kalian semua maka tenggelamkanlah kemudian ambillah lalat itu karena sesungguhnya di salah satu kedua sayap lalat itu ada satu penyakit dan sayap yang lain terdapat obat” (HR.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

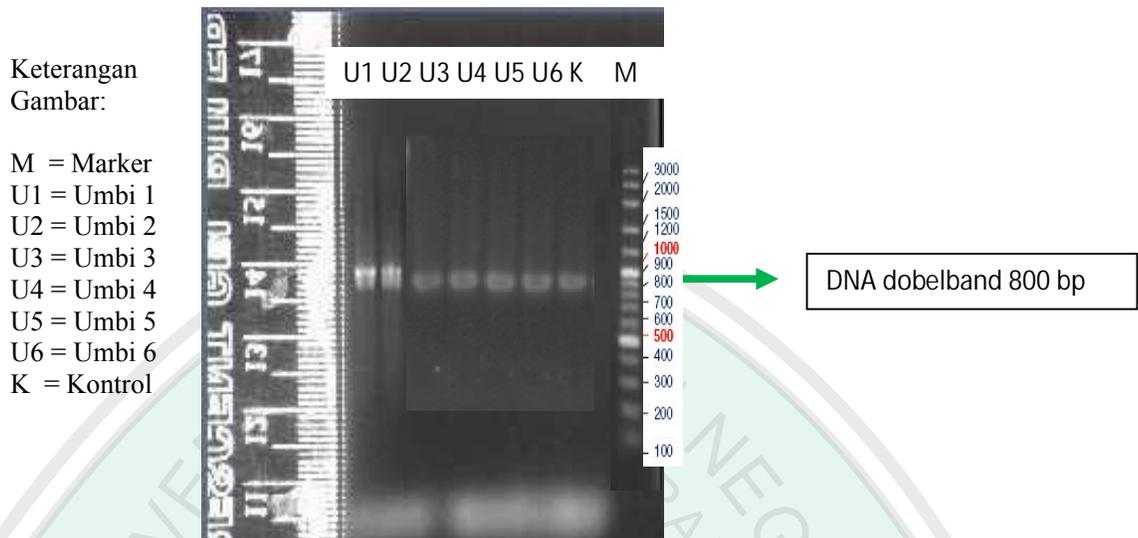
Walau besar sampel sama banyak yang dimasukkan kedalam *well*, itu tidak menentukan panjang basa yang terbaca saat PCR. Ini menandakan adanya perbedaan yang sangat jelas pada tiap spesies, karena pola pita DNA yang muncul pada tiap sampel berbeda.

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).



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 (*sequensing*).

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 et 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 sekuens 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 recombination) dari 30 tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan RX dkk, 2001 dalam Radji, 2005).