

## PENGEMBANGAN BIO-BAKTERISIDA YANG MEMANFAATKAN BAHAN AKTIF BAKTERI ENDOFIT POTENSIAL ANTAGONIS UNTUK MENGENDALIKAN *Erwinia* sp., DI UMBI KENTANG

Eka Kartini, Abdul Latief Abadi, Luqman Qurata Aini

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia

### ABSTRACT

*Erwinia* sp., is a bacterial pathogen as the causal agent of soft rot in potato tubers which infect the potato tuber during in the field as well as in the storage, and could decrease the quality of potato tubers. This study aims to obtain endophytic bacteria from parts of potato plant and to know their effectiveness in controlling *Erwinia* sp., on potato tubers. This study resulted 52 isolates of endophytic bacteria which are able to inhibit the growth of *Erwinia* sp. The higher inhibition of the growth of *Erwinia* sp., were shown by P36 (Endophytic 36) and P38 (Endophytic 38). Endophytic bacteria were able to suppress the growth of soft rot disease on potato tuber compared with that of control which use sterile aquadest as well as with that of bactericide with an active ingredieant of kasugamisin hydrochloride.

**Keywords:** Bacteria, *Erwinia* sp., Soft rot, Endophytic

### ABSTRAK

*Erwinia* sp., merupakan bakteri penyebab penyakit busuk lunak pada umbi kentang yang menyerang di lapangan maupun di gudang penyimpanan dan dapat mengurangi kualitas umbi kentang. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri endofit dari bagian tanaman kentang dan mengetahui efektifitas bakteri endofit untuk mengendalikan *Erwinia* sp., pada umbi kentang. Hasil penelitian didapatkan 52 isolat bakteri endofit yang mampu menghambat pertumbuhan *Erwinia* sp. Penghambatan tertinggi terhadap pertumbuhan *Erwinia* sp., pada cawan Petri ditunjukkan oleh isolat P36 (Endofit 36) dan P38 (Endofit 38). Bakteri endofit mampu menekan perkembangan penyakit busuk lunak pada umbi kentang dibandingkan dengan kontrol yang diinokulasi dengan aquades maupun bakterisida berbahan aktif kasugamisin hidroklorida.

**Kata kunci:** Bakteri, *Erwinia* sp., Busuk lunak, Endofit

### PENDAHULUAN

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu pangan utama dunia setelah padi, gandum, dan jagung. Saat ini produksi kentang mendapat hambatan besar salah satunya oleh faktor biotik yaitu penyakit tanaman. Salah satu penyakit penting yang disebabkan oleh bakteri *Erwinia* sp., adalah penyakit pada kentang baik ketika masih di lapangan maupun di gudang penyimpanan (Addy, 2007). Kondisi

ini memberikan gagasan untuk melakukan pengendalian dengan memanfaatkan teknologi hayati yang lebih efektif dan ramah lingkungan. Diantara bakteri potensial antagonis yang dapat digunakan sebagai pengendali hayati adalah bakteri endofit yaitu bakteri yang hidup didalam jaringan tanaman dan dapat berpindah antar jaringan. Menurut Hallman (1997) bakteri endofit dapat berpengaruh pada kesehatan tanaman dalam hal: antagonisme langsung, menginduksi ketahanan sistemik dan meningkatkan

toleransi tanaman terhadap tekanan lingkungan. Manfaat lain dari aplikasi bakteri ini, yaitu tidak akan meninggalkan residu kimia dan tidak menyebabkan resistensi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai bulan Januari 2014 sampai dengan bulan Juni 2014. Penelitian ini terdiri dari isolasi *Erwinia* sp., dari umbi tanaman kentang yang bergejala, eksplorasi bakteri endofit dari akar tanaman kentang, uji *in vitro* penghambatan filtrat endofit dalam cawan petri, karakterisasi morfologi dan fisiologis bakteri endofit antagonis terhadap *Erwinia* sp. Penelitian yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) untuk pengujian secara *in vitro* dan uji pada umbi kentang. Uji secara *in vitro* di laboratorium dengan 23 perlakuan diulang 3 kali dan uji pada umbi kentang di laboratorium dengan 24 perlakuan diulang 3 kali.

## PELAKSANAAN PENELITIAN

### Isolasi *Erwinia* sp., dari umbi tanaman kentang yang bergejala

Isolasi bakteri *Erwinia* sp., menggunakan metode pengenceran bertingkat. Bakteri patogen yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi pada tingkat genus menurut Kerr (1980) meliputi, uji hipersensitif, uji reaksi gram dengan KOH 3%, uji reaksi Gram dan uji oksidatif-fermentatif.

### Eksplorasi bakteri endofit dari akar tanaman kentang

Eksplorasi bakteri endofit dari akar tanaman kentang sehat dilakukan dengan metode Hallman (1999). Sterilisasi permukaan dilakukan dengan campuran 1.05% sodium hipoklorit dan 0.1% Tween 20 selama 60 detik diikuti dengan tiga kali pencucian menggunakan buffer fosfat steril.

Koloni tunggal hasil dari pemurniaan dipilih dan dipindahkan ke dalam media TSA baru dengan metode penggoresan. Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 27°C dan kemurnian bakteri diamati secara visual setelah 48 jam.

### Uji antagonisme bakteri endofit terhadap *Erwinia* sp., pada cawan petri

Uji antagonisme dilaksanakan menurut Wakimoto *et al.* (1986) dan Hara dan Ono (1991). Bakteri endofit yang telah diinkubasikan selama 2 x 24 jam dibuat pengenceran 10<sup>9</sup> CFU/ml dalam aquades steril. Selanjutnya kertas cakram yang sudah steril dengan diameter 5 mm dimasukkan ke dalam pengenceran selama ±1 menit dan tiriskan pada tisu yang sudah steril selama 2 jam. Kemudian kertas saring yang sudah kering di tanam pada bagian tengah-tengah media NA dan inkubasi selama 2 hari. Bakteri antagonis pada cawan Petri kemudian dilapisi (*dioverlay*) dengan pengenceran bakteri patogen dicampur dengan 14 ml media NA pada suhu ± 45°C. Hasil *overlay* tersebut diinkubasi selama 48 jam dan diamati daerah hambatan yang terbentuk.

### Uji *in vitro* penghambatan filtrat endofit dalam cawan petri

Uji penghambatan filtrat bakteri endofit dibuat dengan metode Wakimoto *et al.* (1986). Bakteri endofit yang memiliki sifat antibiosis dibiakkan pada media NB dalam tabung reaksi, dan digojok selama 24 jam dalam suhu kamar. Sebanyak 1 ml biakan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000g. Supernatan difiltrasi menggunakan *filter syringe* dengan lubang pori berukuran 0.2 µm sebanyak dua kali. Kertas saring (diameter 5 mm) direndam dalam filtrat, dikeringanginkan dan ditanam pada media NA padat dalam cawan petri yang telah disebar dengan bakteri *Erwinia* sp. Setelah diinkubasi selama 48 jam, diukur diameter daerah hambatan yang terbentuk.

### **Karakterisasi morfologi dan fisiologis bakteri endofit antagonis terhadap *Erwinia* sp.**

Karakterisasi bakteri endofit antagonis dilaksanakan menurut Kerr (1980) meliputi uji reaksi hipersensitif pada tembakau, uji Gram. Uji fisiologi meliputi produksi pigmen fluorescense, reduksi nitrat, oksidatif-fermentatif, akumulasi, dan uji katalase.

### **Uji antagonis bakteri endofit terhadap patogen *Erwinia* sp., pada umbi kentang**

Uji antagonis bakteri endofit terhadap patogen *Erwinia* sp., pada umbi kentang dibuat dengan metode menurut Haque *et al* (2009). Permukaan umbi kentang varietas Granola disterilisasi dengan perendaman dalam sodium hipoklorit 1% selama 10 menit, kemudian dicuci dengan aquades steril tiga kali dan kering anginkan. Kentang dilubangi menggunakan ujung mikropipet tip, lalu diinokulasikan dengan bakteri endofit sebanyak 50 µl kemudian dibiarkan selama 1-2 jam sampai kering. Setelah itu pada lubang yang sama diinokulasi suspensi bakteri patogen *Erwinia* sp., pada konsentrasi 10<sup>9</sup> cfu/ml sebanyak 50 µl. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Umbi kentang diinkubasi dalam wadah lembab pada suhu kamar selama 7 hari.

## **ANALISIS STATISTIK**

Data yang diperoleh dari pengamatan percobaan pada cawan Petri dan massa busuk lunak pada jaringan umbi ini dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dan apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kesalahan 5%.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Isolasi Penyebab Busuk Lunak**

Isolasi dari umbi tanaman kentang yang terkena penyakit busuk lunak telah menghasilkan 3 isolat bakteri murni yang

diberi nama Er 1, Er 2 dan Er 3 yang diduga *Erwinia* sp., (Tabel 1). Gejala yang dihasilkan berupa hancurnya jaringan tumbuhan akibat adanya aktivitas pektolitik, umbi menjadi lunak, dan gejalanya cepat meluas. Patogen penyebab busuk lunak menyerang jaringan parenkim dan menghancurkan lamela tengah kemudian diikuti oleh kematian sel (Sinaga, 2006). Hasil inokulasi menunjukkan hanya satu isolat yaitu isolat bakteri Er2 dapat menghasilkan busuk lunak seperti yang dipaparkan. Berdasarkan hasil karakterisasi, isolat bakteri tersebut termasuk dalam genus *Erwinia* (Tabel 2).

### **Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri Penyakit Busuk Lunak**

Hasil pengamatan morfologi masing-masing isolat bakteri yang diduga sebagai patogen *Erwinia* sp., memiliki ciri-ciri yang sama (Tabel 1). Kenampakan morfologi dari isolat Er 2 yang sama dengan isolat lainnya kemudian dilanjutkan pada pengujian secara fisiologi. Bakteri yang diperoleh dari hasil reisolasi dan menghasilkan gejala busuk lunak selanjutnya diidentifikasi meliputi: uji hipersensitif, uji patogenesitas, pengamatan morfologi koloni, uji fisiologi dan biokimia menurut Schaad *et al.* (2001).

Hasil karakterisasi bakteri patogen yang menunjukkan gejala busuk lunak termasuk kelompok Gram negatif (Tabel 2). Ciri bakteri Gram negatif yaitu struktur dinding sel tipis, kurang rentan terhadap penisilin, dan kurang resisten terhadap gangguan fisik (Pelczar dan Chan, 1986). Pada uji oksidatif - fermentatif diketahui isolat tersebut bersifat fermentatif merupakan sifat dari genus *Erwinia* (Baker and Cook, 1974). Pada uji patogenesitas kentang yang telah disuntik isolat bakteri kemudian mengalami gejala busuk dan lunak. Menurut Mehrotra dan Aggarwal (2005), *Erwinia* dari kelompok carotovora memiliki aktivitas pektolitik yang tinggi dan dapat menyebabkan busuk lunak pada jaringan tanaman.

Tabel 1. Ciri-ciri morfologi isolat bakteri patogen penyebab penyakit busuk lunak yang diduga bakteri *Erwinia* sp.

Isolat	Bentuk	Permukaan	Warna	Tepi
Er1	Bulat	Cembung	Putih	Rata
Er2	Bulat	Cembung	Putih	Rata
Er3	Bulat	Cembung	Putih	Rata

Keterangan: Kode isolat Er = Isolat *Erwinia* sp.

Tabel 2. Identifikasi bakteri patogen *Erwinia* sp.

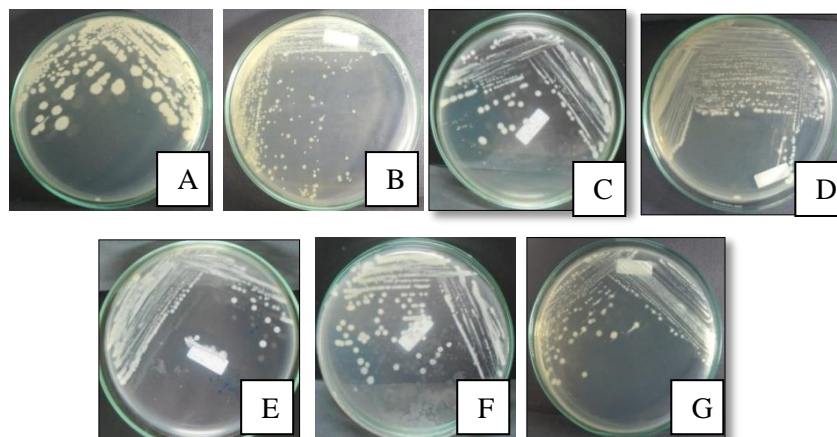
Uji Fisiologi dan Biokimia	Isolat bakteri	Literatur Schaad <i>et al.</i> (2001)
Uji Busuk Lunak	+	+
Uji Patogenisitas	+	+
Uji Hipersensitif	+	+
Pertumbuhan Media YDC	+	+
Uji Reaksi Gram		
a. KOH 3%	-	-
b. Pengecatan gram	-	-
Uji Oksidatif-Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif
Pertumbuhan di medium King's B	+	+
Pigmen Fluorescens di Medium Kings'B	-	-

Keterangan: Identifikasi bakteri patogen *Erwinia* sp. (Er2)

**Eksplorasi bakteri endofit yang bersifat antagonis terhadap *Erwinia* sp.**

Hasil dari eksplorasi bakteri endofit pada akar tanaman kentang didapatkan 99 isolat. Isolat tersebut selanjutnya diuji potensi

antagonis terhadap *Erwinia* sp yang ditumbuhkan pada media NA. Zona hambat yang terbentuk diantara koloni bakteri patogen dan bakteri endofit menunjukkan adanya sifat antagonis.



Gambar 1. Bentuk pertumbuhan koloni bakteri endofit yang digunakan dalam pengujian pada media NA. A: bakteri endofit dengan kode isolat 36, B: bakteri endofit dengan kode isolat 38, C: bakteri endofit dengan kode isolat 39, D: bakteri endofit dengan kode isolat 40, E: bakteri endofit dengan kode isolat 42, F: bakteri endofit dengan kode isolat 98, dan G: bakteri endofit dengan kode isolat 99.

Hasil seleksi dari 99 bakteri endofit didapatkan 57 isolat yang antagonis terhadap bakteri *Erwinia* sp. Bentuk pertumbuhan koloni bakteri endofit yang digunakan dalam pengujian pada media NA (Gambar 1). Berdasarkan penelitian Hallmann (2001) populasi bakteri endofit dipengaruhi oleh jenis tanaman, umur tanaman, tipe jaringan (akar, batang, daun), habitat, dan faktor lingkungan.

#### **Uji antagonis endofit terseleksi terhadap *Erwinia* sp.**

Sejumlah 57 isolat tersebut diuji antagonisnya kembali terhadap *Erwinia* sp. Hasil uji menunjukkan bahwa semua perlakuan bakteri endofit maupun bakterisida berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri patogen pada cawan Petri. Bakteri endofit E36, E38, E39, E40, E42, E98 dan E99 dapat menekan pertumbuhan *Erwinia* sp., (Gambar 2) perlakuan tersebut berbeda nyata dengan perlakuan kontrol inokulasi menggunakan akuades (POA). Perlakuan E36 dan E38 lebih tinggi dibandingkan perlakuan POB (kontrol bakterisida berbahan aktif kasugamisin hidroklorida dan tembaga oksiklorida (Gambar 3). Beberapa bakteri endofit dilaporkan dapat berperan sebagai agen hayati yang berasosiasi dengan tanaman inangnya (Long *et al.*, 2008). Dalam penelitian ini isolat bakteri endofit yang terpilih menunjukkan reaksi antibiosis terhadap *Erwinia* sp. Mekanisme antibiosis berkaitan erat dengan kemampuan isolat bakteri endofit menghasilkan enzim seperti kitinase, protease, dan selulase maupun senyawa sekunder lainnya yang sangat berperan dalam menginduksi ketahanan tanaman (Hallmann *et al.*, 1997). Berdasarkan hasil pengujian bakteri endofit E36, E38, E39 E42, dan E99 menunjukkan indeks zona hambat yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, sedangkan bakteri endofit E40 dan E98 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

#### **Uji Filtrat Bakteri Endofit Terseleksi terhadap *Erwinia* sp.**

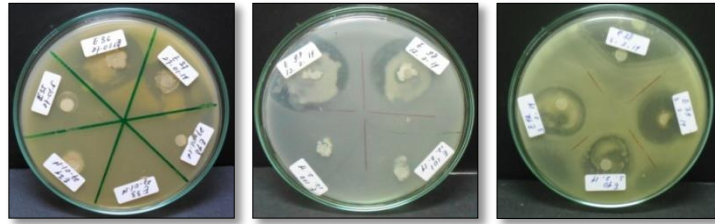
Hasil uji penghambatan filtrat diketahui hanya dua isolat bakteri endofit yang mampu menghasilkan zona hambat yaitu endofit 98 dan 99. Hal ini menunjukkan bahwa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri endofit 98 (luas zona hambat 0,009 cm) dan endofit 99 (luas zona hambat 0,0127 cm) lebih sensitif menghambat pertumbuhan bakteri *Erwinia* sp., dibandingkan dengan endofit 36, 38, 39, 40 dan 42 tidak menghasilkan zona bening.

#### **Karakterisasi Morfologi Bakteri Endofit**

Bakteri endofit yang terpilih digoreskan pada media NA padat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar bertujuan untuk menghasilkan koloni tunggal yang akan diamati. Hasil dari pengamatan morfologi dari isolat bakteri yang didapatkan ciri-ciri seperti pada Tabel 3.

#### **Uji Antagonis Penyakit Busuk Lunak pada Umbi Kentang**

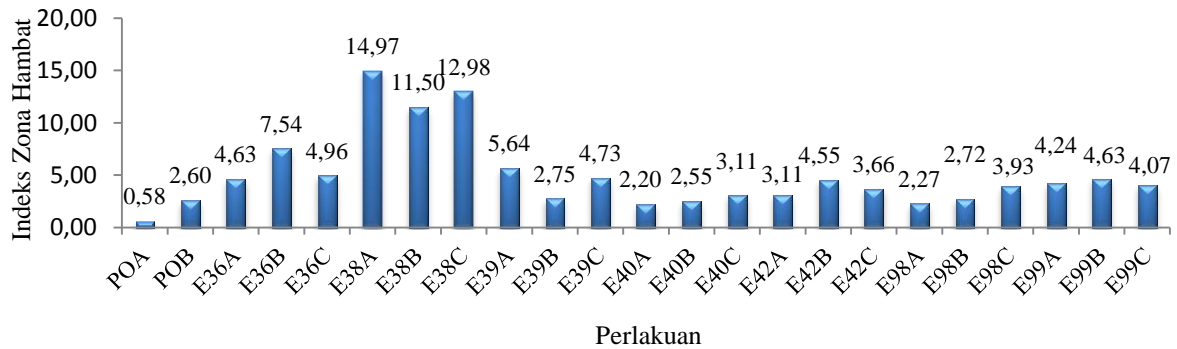
Hasil pengamatan menunjukkan bakteri endofit yang terpilih mempunyai potensi penghambatan terhadap perkembangan penyakit busuk lunak pada umbi kentang. Bakteri endofit mampu menekan pertumbuhan bakteri *Erwinia* sp., dibuktikan dengan berat bagian yang busuk lunak mencapai 0,048% hingga 3,75% dibandingkan dengan penekanan kontrol yang diinokulasikan dengan bakterisida berbahan aktif kasugamisin hidroklorida, tembaga oksiklorida (POB) menghasilkan berat bagian umbi yang terserang lebih besar mencapai 59.58%. Perlakuan bakteri endofit maupun bakterisida mampu menekan pertumbuhan *Erwinia* sp. (Gambar 4) bila dibandingkan dengan kontrol yang diinokulasi dengan bakteri *Erwinia* sp., dan akuades (POC).



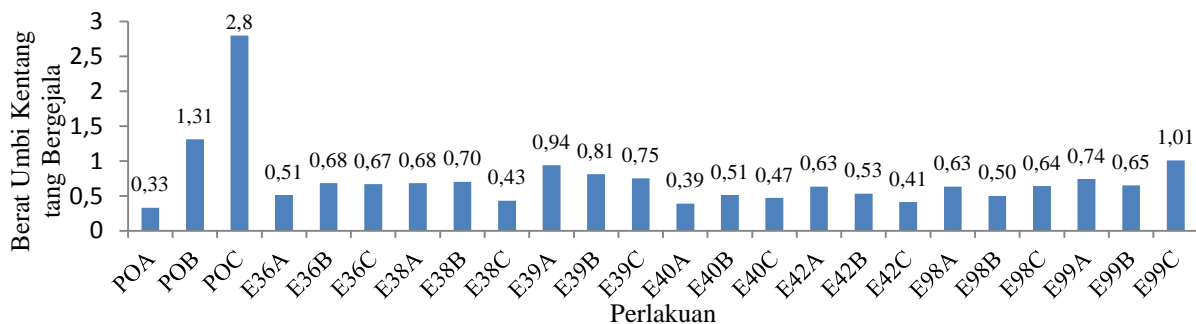
Gambar 2. Zona hambat yang terbentuk pada bakteri endofit endofit. (A) isolat bakteri endofit 36 (bakteri endofit dengan kode E36), endofit 39 (bakteri endofit dengan kode E39), (B) endofit 40 (bakteri endofit dengan kode E40) dan 42 (bakteri endofit dengan kode E42) Endofit 98 (Ebakteri endofit dengan kode 98), dan (C) endofit 99 (E99) terhadap *Erwinia* sp.

Tabel 3. Ciri-ciri morfologi isolat bakteri endofit yang digunakan dalam pengujian di cawan petri dan umbi kentang

Isolat	Bentuk	Permukaan	Warna	Tepi
E36	Bulat	Cembung	Putih kekuningan	Bergerigi
E38	Bulat	Cembung	Putih kekuningan	Rata
E39	Bulat	Cembung	Putih	Rata
E40	Bulat	Cembung	Putih kekuningan	Rata
E42	Lonjong	Cembung	Putih	Rata
E98	Bulat	Cembung	Putih	Rata
E99	Bulat	Cembung	Putih	Rata



Gambar 3. Penghambatan bakteri endofit terhadap *Erwinia* sp. (POA): aplikasi menggunakan aquades, kontrol (POB) aplikasi menggunakan bakterisida berbahan aktif kasugamisin hidroklorida dan tembaga oksiklorida. Kode endofit isolat 36, 38, 39, 40, 42, 98, dan 99 dengan masing-masing kode pengenceran A, B, dan C ( $10^7, 10^9, 10^{11}$  CFU/ml).



Gambar 4. Uji antagonis antar jenis bakteri. POA: kontrol ( diinokulasikan dengan akuades), POB: kontrol (diinokulasikan dengan bakterisida berbahan aktif kasugamisin hidroklorida, tembaga oksiklorida), POC: kontrol (diinokulasikan dengan bakteri *Erwinia* sp dan akuades).

### KESIMPULAN

1. Hasil eksplorasi didapatkan 99 isolat bakteri endofit, 57 isolat bakteri endofit mampu menghasilkan zona hambat dan penekanan terbaik dihasilkan oleh 7 isolat bakteri endofit.
2. Penghambatan filtrat bakteri endofit 36 dan 38 mampu menghambat pertumbuhan *Erwinia* sp.
3. Bakteri endofit mampu menekan perkembangan penyakit busuk lunak pada umbi kentang dengan kemampuan yang setara dengan bakterisida.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian mengenai aplikasi kombinasi antar bakteri endofit serta frekuensi aplikasinya pada tanaman dalam skala lapang.

### DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H.S. 2007. Pengaruh Sumber Mineral Terhadap Penekanan *Erwinia carotovora* oleh *Pseudomonas* pendar-fluor Secara In Vitro. Jurnal HPT Tropika. Volume 7. No. 2.
- Bacon, C.W, Hinton D.M. 2006. Bacterial endophytes : the endophytic niche, its occupants, and its utility. Di dalam : Gnanamanickam SS, editor. *Plant-Associated Bacteria*. Netherland : Springer.
- Hallman, J, A. Quadt-Hallmann, W.F Mahaffee, dan J.W. Kloepper. 1997. Bacterial Endophytes in Agricultural Crops. Can. J. Microbiol. 43:895 – 914
- Hallman, J. 1999. Interaction with Prokaryotes: Plant Interaction with Endophytic Bacteria. BSPP Presidential Meeting. [www.bspp.co.uk](http://www.bspp.co.uk).
- Haque, M.M., M. Shahinur Kabir, Luqman Qurata Aini, Hisae Hirata dan Shinji Tsuyumu. 2009. SlyA, a MarR Family Transcriptional Regulator, Is Essential for Virulence in *Dickeya dadantii* 3937. Journal of Bacteriology. Vol. 191. No. 17.
- Kerr, A. 1980. Bacteria and Mycoplasma as a Parasite, pp. 133-144. In JF. Brown, A. Kerr, F.G. Morgan dan I.H. Parbey. A course Manual in Plant Protection. Australian Vice-Chancellor Committee. Australia.
- Long, Hoang Hoa., Schmidt, Dominik D., Baldwin, Ian T. 2008. Native Bacterial Endophytes Promote Host Growth in a Species-Specific Manner; Phytohormone Manipulations Do Not Result in Common Growth Responses. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002702>. Akses 29 Mei 2009
- Purwanto. 2008. Peranan Mikroorganisme Endofit sebagai Penghasil Antibiotik. [www.kabarindonesia.com](http://www.kabarindonesia.com). Akses 5 Juni 2014.
- Raaijmakers, J.M, Bonsall, R.f dan weller, DM 1999, 'Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat', *Phytopathol.*, vol. 89, pp. 470-75
- Ramamoorthy V, R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasan, dan R. Samiyappan. 2001 Induction of Systemic Resistance by Plant Growth Promoting Rhizobacteria

- in Crop Plants Against Pests and Diseases. *Crop Protection* 20: 1-11. [www.Elsevier.com/locate/cropro](http://www.Elsevier.com/locate/cropro)
- Schaad, N., J. Jones dan W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd Edition. APS Press. Amerika. Hal 1-71.
- Sinaga M.S. 2006. *Dasar-dasar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Ed ke-2 Jakarta:Penebar Swadaya.
- Sturz, A.V, B.R Christie, B.G Matheson, W.J Arsenault dan N.A Buchanan. 1999. Endophytic Bacterial Communities in the periderm of Potato Tubers and Their Potential to Improve Resistance to Soil-borne Pathogen. *Plant Pathology* 48:360-369
- Wakimoto, S. *et al.* 1986. Production of antibiotics by Plant Pathogenic Pseudomonas. *Ann. Phytopathology Society. Japan* (52): 835-842p.