

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BIOLOGI BAKTERI ENDOFIT, FILOSFER DAN RIZOSFER DARI TANAMAN SAGU (*Metroxylon sagu*)

Bayo Alhusaeri Siregar^{1,2)}, Niken Nur Kasim^{1,3)}, Naimatul Farida¹⁾

¹⁾Program Studi Fitopatologi, IPB University, Bogor, Jawa Barat 16680

²⁾Departemen Plant Protection, R&D PT. Arara Abadi, Perawang, Riau 28772

³⁾Program Studi Agroteknologi, Universitas Andi Djemma, Palopo, Sulawesi Selatan 91911

Email: bayo.alhusaeri@yahoo.com

ABSTRAK

Sagu (*Metroxylon sagu*) tumbuh secara alami dan menyebar di Bagian Timur Indonesia digunakan sebagai sumber makanan alternatif non-beras dan dapat diolah menjadi bioetanol. Perkebunan sagu rakyat sebagian besar dibudidayakan secara alami dan tidak ada aktivitas budidaya yang intensif sehingga memiliki tingkat keragaman flora dan fauna yang masih tinggi. Interaksi mikroba dan tanaman dapat bersifat simbiosis mutualisme dengan membantu tanaman mendapatkan unsur hara dan sebagai anti mikroba bagi patogen yang merugikan tanaman inangnya. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit dari tanaman sagu, serta mengetahui potensinya sebagai agens pengendali patogen *Fusarium sp.* Pengambilan sampel dari pertanaman sagu di Kec. Wasuponda, Kab. Luwu Timur, Provinsi Sulawesi Selatan. Isolasi bakteri dilakukan terhadap bakteri endofit, filosfer dan rizosfer sagu. Karakterisasi bakteri dilakukan dengan uji gram, pelarut fosfat, agen antagonis, uji agar darah dan hipersensitif. Sebanyak 34 isolat didapat dari tanaman sagu sebagai bakteri endofit, filosfer dan rizosfer. Sebagian besar bakteri tidak tergolong sebagai patogen pada manusia, hewan atau tanaman. Terdapat 8 isolat bakteri yang memiliki kemampuan sebagai bakteri pelarut fosfat. Bakteri filosfer dengan kode isolat 21 memiliki kemampuan penghambatan terbesar yaitu 40% terhadap patogen *Fusarium sp.* yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pengendali hayati.

Kata Kunci: Sagu, mikrobioma, interaksi mikroba-tanaman.

PENDAHULUAN

Tanaman Sagu (*Metroxylon sagu*) merupakan tanaman tropis yang banyak tumbuh secara alami dan menyebar di Bagian Timur Indonesia (termasuk Zona Wallacea). Sagu digunakan sebagai sumber makanan alternatif non-beras yang penting di Indonesia sehingga menjadi salah satu komoditas unggulan. Selain menjadi sumber pangan, tanaman sagu juga dapat diolah menjadi bioetanol. Siklus hidup pohon sagu adalah periode jangka panjang (8 - 12 tahun) (Amarilis *et al.* 2009).

Perkebunan sagu rakyat sebagian besar dibudidayakan secara alami di lapangan dan tidak terdapat aktivitas budidaya yang intensif sehingga memiliki tingkat keragaman flora dan fauna yang masih tinggi. Mikroorganisme merupakan salah satu jenis makhluk hidup yang memiliki keragaman dan kelimpahan yang

tinggi pada kondisi alami. Interaksi mikroba dan tanaman inang memiliki hubungan yang erat khususnya pada interaksi secara mutualisme.

Tanaman memaksimalkan pertumbuhannya melalui pertumbuhan akar sehingga dapat memiliki jangkauan maksimal terhadap unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhannya. Di samping itu, tanaman juga berusaha menjalin interaksi dengan mikroba untuk membantu mengoptimasi pemenuhan kebutuhan haranya dan untuk membentengi dirinya terhadap serangan organisme pengganggu tanaman. Setidaknya interaksi mikroba (bakteri) dan tanaman dapat terjadi pada daerah permukaan daun (filosfer), permukaan akar (rizosfer) dan di dalam sel tanaman (endofit). Peranan utama mikroba tersebut adalah membantu tanaman mendapatkan unsur hara dan sebagai anti

mikroba bagi patogen yang merugikan tanaman inangnya. Keuntungan yang didapat oleh mikroba adalah mendapat habitat dan memperoleh suplai makanan dari tanaman (Widyati 2013). Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit dari tanaman sagu, serta mengetahui potensinya sebagai agens pengendali patogen *Fusarium sp.* Manfaat yang diperoleh berupa didaptkannya mikrobioma tanaman sagu yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kesehatan tanaman sagu.

METODE PENELITIAN

Sampel tanaman dan rizosfer sagu diambil dari pertanaman sagu di Kec. Wasuponda, Kab. Luwu Timur, Provinsi Sulawesi Selatan. Analisa laboratorium dilakukan di Departemen Proteksi, Institut Pertanian Bogor, dari bulan Januari – Mei 2018.

Penyiapan Sampel

Bakteri filosfer diisolasi dari daun sagu, bakteri rizosfer diisolasi dari tanah di sekitar perakaran sagu, dan bakteri endofit diisolasi dari batang sagu. Daun, tanah, dan batang ditimbang sebanyak 1 gram. Daun dan tanah dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi aquades steril 10 ml, divorteks, diencerkan hingga tingkat pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} . Batang sagu disterilisasi permukaan dengan NaOCl selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, kemudian dibilas dengan aquades selama 2 menit. Pembilasan dilakukan dua kali. Batang yang telah disterilisasi ditambah aquades steril 10 ml, digerus, diencerkan hingga tingkat pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} .

Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Ekstrak sampel daun, tanah dan batang sebanyak 100 μ l dari setiap pengenceran, diteteskan pada media TSA 20% dan King's B 20% di dalam petridish, kemudian diratakan dengan L glass. Media Pikovskaya 20% digunakan untuk menumbuhkan bakteri endofit dari batang dan bakteri rizosfer (dari tanah di sekitar perakaran). Pengamatan dilakukan 24 jam setelah isolasi. Parameter yang diamati adalah jumlah koloni bakteri dan jenis bakteri

(berdasarkan warna dan bentuk koloni). Setiap koloni bakteri yang memiliki bentuk dan warna yang berbeda, dimurnikan dengan cara dipindahkan pada media baru secara tunggal, dan diberi kode untuk setiap isolat yang dimurnikan.

Uji Keamanan Hayati

Uji keamanan hayati dilakukan untuk memisahkan koleksi isolat bakteri yang memiliki potensi sebagai patogen pada tanaman, hewan, dan manusia.

Uji hemolisis

Isolat bakteri yang akan diuji dilakukan peremajaan dulu pada media padat, 2 hari sebelum pengujian. Isolat diambil dari media peremajaan dengan bantuan tusuk gigi steril, diinokulasikan pada media agar darah, diinkubasi pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan 1-2 hari setelah pengujian. Parameter pengamatan adalah ada tidaknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh. Zona bening menunjukkan adanya hemolisis dan isolat bakteri berpotensi sebagai patogen hewan dan manusia.

Uji hipersensitif

Koleksi isolat bakteri yang diperoleh ditumbuhkan pada media cair NB dan diinkubasi selama 2 hari dengan *orbital shaker*. Suspensi bakteri diambil dengan bantuan suntikan, diinjeksikan pada daun tembakau di bagian bawah. Setiap jenis bakteri yang diinjeksikan diberikan tanda dengan label, dan diinkubasi selama 1–2 hari. Pengamatan dilakukan terhadap gejala hipersensitif, yaitu nekrosis pada bagian daun yang diinjeksi dengan suspensi bakteri. Gejala nekrosis menunjukkan isolat bakteri berpotensi sebagai patogen tanaman.

Karakterisasi Isolat Bakteri

Pengujian karakter fisiologi bakteri dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologi bakteri. Pengujian yang dilakukan meliputi uji gram, uji kitinolitik. dan uji aktivitas pelarutan fosfat.

Uji gram

Uji gram dilakukan dengan larutan KOH 3%, untuk mengetahui sifat gram bakteri yang telah dikoleksi, positif atau negatif. Isolat bakteri yang akan diuji diremajakan terlebih dahulu pada media padat, 2 hari sebelum pengujian. Larutan KOH 3% diteteskan pada plastik tebal, sebanyak sejumlah isolat yang akan diuji. Koloni bakteri diambil dengan tusuk gigi steril, dicampurkan dengan larutan KOH 3%, kemudian diangkat. Pengamatan dilakukan terhadap terbentuk tidaknya lendir dari campuran larutan KOH dan isolat bakteri. Jika terbentuk lendir menunjukkan gram negatif, dan sebaliknya.

Uji aktivitas pelarutan fosfat

Uji aktifitas pelarutan fosfat dilakukan pada media Pikovskaya. Isolat bakteri yang akan diuji diremajakan pada media padat, 2 hari sebelum pengujian. Isolat bakteri diambil dari media padat dengan tusuk gigi steril, diinokulasikan pada media Pikovskaya, diinkubasi pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan 2 – 3 hari setelah inokulasi. Parameter yang diamati adalah ada tidaknya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Uji kitinolitik

Media uji yang digunakan adalah media kitin. Isolat bakteri yang akan diuji diremajakan terlebih dahulu pada media padat, 2 hari sebelum pengujian. Koloni bakteri diambil dengan tusuk gigi steril, digoreskan pada media kitin padat, diinkubasi pada suhu ruang selama 2 – 3 hari. Pengamatan dilakukan terhadap ada tidaknya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Uji Antagonisme

Uji antagonis dilakukan untuk mengetahui potensi isolat bakteri untuk mengendalikan patogen. Pengujian sifat antagonisme dilakukan secara *dual culture* terhadap jamur patogen *Fusarium* spp. Isolat bakteri yang akan diujikan diremajakan pada media padat, 2 hari sebelum pengujian. Isolat *Fusarium* spp. pada media padat, dipotong – potong dengan *cork borer*, sehingga dihasilkan 1 bulatan koloni yang sama. Media padat disiapkan, dibagi menjadi 4 bagian

yang sama. Isolat *Fusarium* diletakkan di tengah media padat. Koloni bakteri diambil dengan tusuk gigi steril, digoreskan pada setiap 4 bagian secara horizontal. Media diinkubasi selama 5 – 7 hari pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan dengan mengukur jari - jari pertumbuhan *Fusarium* spp. pada media uji dan kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Populasi Bakteri Endofit, Rizosfer dan Filosfer

Berdasarkan penghitungan populasi bakteri didapatkan bahwa populasi bakteri rizosfer, filofosfer dan endofit asal tanaman sagu secara umum ada pada kisaran 10^5 - 10^7 cfu/ml (Tabel 1). Pemurnian isolat dilakukan dengan memisahkan koloni tunggal dari masing-masing bakteri berdasarkan pengamatan secara morfologi yaitu melihat karakter variasi dari masing-masing bakteri (warna, bentuk, elevasi, tepian dan diameter ukuran koloni). Isolasi pada tanaman sagu didapatkan 13 isolat bakteri rizosfer, 11 isolat bakteri filofosfer dan 10 isolat bakteri endofit yang dibedakan secara morfologis bakteri. Isolat-isolat ini (34 isolat) kemudian akan digunakan dalam pengujian-pengujian berikutnya (keamanan hayati, fisiologi dan antagonisme) untuk mendapatkan karakter dari masing-masing isolat.

Uji Keamanan Hayati

Dalam pemanfaatan bakteri rizosfer, filofosfer dan endofit asal tanaman sagu untuk memicu pertumbuhan tanaman atau menekan perkembangan penyakit tanaman memerlukan uji keamanan hayati agar isolat-isolat bakteri yang digunakan aman bagi lingkungan (tanaman, hewan dan manusia).

Hasil pengujian menunjukkan terdapat 1 isolat bakteri endofit (isolat 06) memiliki sifat hemolitik. Bakteri yang bersifat hemolitik ditandai dengan timbulnya zona bening di sekitar atau di bawah isolat pada media agar darah. Sehingga 33 isolat bakteri yang bersifat non-hemolitik dan akan digunakan pada pengujian hipersensitif pada tanaman.

Tabel 1. Populasi bakteri pada setiap media tumbuh dan tingkat pengenceran sampel

Jenis Bakteri	Populasi Bakteri pada Media (cfu/ml)			Jumlah Isolat
	King's B	TSA	Pikovskaya	
Rizosfer	3.10 X 10 ⁶	6.30 X 10 ⁶	7.00 X 10 ⁵	13
Filosfer	1.38 X 10 ⁷	6.00 X 10 ⁶	4.80 X 10 ⁶	11
Endofit	6.00 X 10 ⁵	11.1 X 10 ⁷	-	10

Keterangan : - , tidak dilakukan

Hasil uji hipersensitif bakteri pada daun tembakau menunjukkan bahwa dari 33 isolat bakteri yang diuji terdapat 6 isolat (2 isolat bakteri filosfer dan 4 isolat bakteri rizosfer) yang bereaksi positif. Ditandai dengan adanya gejala nekrotik pada daun tembakau setelah diinokulasikan atau setelah disuntikkan bakteri dan diinkubasi selama 48 jam.

Keruntuhan total jaringan tanaman setelah 24 jam diikuti oleh nekrosis dicatat sebagai reaksi positif untuk ujihipersensitif (Baharuddin, *et al*, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri yang diuji bersifat patogen terhadap tanaman. Sedangkan 27 isolat lainnya tidak menunjukkan gejala nekrotik pada daun tembakau yang menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak bersifat patogen terhadap tanaman.

Karakter Fisiologi Bakteri

Dari 27 isolat yang diuji menunjukkan terdapat 22 isolat tergolong bakteri gram positif dan 5 isolat bakteri gram negatif (Tabel 2). Isolat bakteri yang diuji dengan KOH 3% akan terbentuk suspensi yang encer atau tidak lengket menandakan bakteri tersebut tergolong bakteri gram positif (+). Hal ini dikarenakan Gram

positif memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis sedangkan Gram negatif berlemak tebal dan berdinding sel tipis yang berada di ruang periplasma.

Dari 27 isolat yang diuji menunjukkan terdapat 8 isolat tergolong bakteri pelarut fosfat (Tabel 2). Tingkat pelarutan fosfat dapat terlihat dari terbentuknya zona bening dari media Pikovskaya yang mengandung Ca₃(PO₄)³ yang sukar larut di dalam media. Fosfat merupakan salah satu unsur hara makro yang sangat dibutuhkan tanaman, namun di lapangan tidak dapat larut pada air sehingga tidak tersedia bagi tanaman.

Penambahan pupuk fosfat pun tidak akan meningkatkan ketersediaan unsur fosfat jika tidak dapat diurai bagi tanaman. Bakteri pelarut fosfat mampu mendegradasi fosfat di lapangan dari bentuk tidak tersedia menjadi bentuk tersedia, sehingga tanaman dapat memanfaatkan fosfat tersebut untuk memenuhi kebutuhannya. Dari 27 isolat yang diuji menunjukkan tidak terdapat isolat bakteri yang dapat bersifat sebagai bakteri kitinolitik (bakteri pendegradasi kitin) (Tabel 2).

Tabel 2. Karakter fisiologi bakteri hasil isolasi

Jenis Bakteri	Kode Isolat	Karakter fisiologi		
		Gram	Pelarut fosfat	Kitinolitik
Bakteri Endofit	02	Positif	-	-
	05	Positif	-	-
	08	Negatif	-	-
	09	Positif	-	-
	16	Positif	-	-
	17	Positif	-	-
	18	Positif	-	-
	24	Positif	-	-
	27	Positif	+	-
Bakteri Filosfer	01	Positif	-	-
	10	Positif	+	-
	11	Positif	-	-
	12	Negatif	+	-
	19	Positif	-	-

	21	Positif	-	-
	22	Positif	-	-
	29	Positif	-	-
	34	Positif	+	-
	07	Positif	+	-
	13	Negatif	-	-
	14	Positif	+	-
Bakteri	15	Negatif	-	-
Rizosfer	20	Positif	-	-
	23	Positif	-	-
	28	Positif	-	-
	30	Negatif	+	-
	32	Positif	+	-

Uji Antagonisme

Dari 8 isolat bakteri yang dilakukan uji penghambatan tumbuh terhadap patogen *Fusarium* sp. menunjukkan terdapat 5 isolat bakteri (3 isolat bakteri filosfer dan 2 isolat bakteri rizosfer) yang memiliki kemampuan penghambatan terhadap patogen.

Tingkat penghambatan koloni bervariasi antara 4-40% (tabel 3). Hal ini menunjukkan adanya potensi isolat-isolat bakteri asal tanaman

sagu dapat berperan sebagai agen pengendali hayati.

Bakteri filosfer dan rizosfer mampu menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp. dengan cara membatasi pertumbuhan cendawan patogen tersebut. Kemampuan tersebut diduga karena bakteri menghasilkan antibiotik, enzim atau metabolit lainnya yang dapat menghambat, membatasi atau mendegradasi dinding sel cendawan *Fusarium* sp.

Tabel 3. Pertumbuhan *Fusarium* spp. pada media uji *dual culture* dan kontrol

Jenis Bakteri	Kode Isolat	Jari-jari (cm) koloni <i>Fusarium</i>	Penghambatan (%)*
Bakteri Endofit	06	2.5	0
	09	2.5	0
Bakteri Filosfer	10	2.5	0
	11	2.2	12
	21	1.5	40
	22	2	20
Bakteri Rizosfer	28	2.4	4
	14	2.4	4
-	Kontrol	2.5	-

* Penghambatan relatif terhadap kontrol

Bakteri filosfer adalah bakteri epifit yang menghuni di sekitar permukaan daun. Beragam isolat bakteri filosfer ditemukan pada berbagai daun karena populasi bakteri epifit sangat berbeda jenis dan ukurannya pada berbagai tumbuhan meskipun dalam satu spesies (Lindow & Brandl 2003). Pada kelembapan tinggi seperti di daerah tropis dan sedang, berbagai mikroflora daun banyak ditemukan di sana (Madigan *et al.*, 1997). Walaupun pada filosfer kandungan nutrisi sangat sedikit dibandingkan di daerah rizosfer, kehadiran bakteri filosfer pada daun memanfaatkan nutrisi berupa seperti deposisi debu, percikan tanah, tepungsari, embun madu, sekresi cairan gutasi dari hidatoda yaitu ion

anorganik (K^+ , Mg^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+}) karbohidrat dan asam amino (Andrews dan Harris 2000).

Bakteri rizosfer (rizobakteria) merupakan kelompok bakteri yang hidup dan berkembang di daerah rizosfer tanaman dan berpotensi meningkatkan produktivitas dan pertumbuhan tanaman (Gray & Smith 2005, Ryu 2003). Rizobakteria yang mampu meningkatkan produktivitas dan pertumbuhan tanaman serta berpotensi menjadi agen antagonis untuk bakteri dan fungi disebut *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Widodo 2006).

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme menguntungkan yang berinteraksi dengan tanaman inang tanpa

menyebabkan gangguan atau kerusakan pada tanaman tersebut (Purwanto, 2014). Dalam proses koevolusi bakteri diduga bahwa, bakteri endofit berasal dari lingkungan luar tumbuhan dan kemudian masuk ke dalam jaringan tumbuhan melalui stomata, lentisel, luka, daerah pemunculan tunas akar lateral dan tunas perkecambahan (Huang, 1986).

Secara umum, terdapat potensi pemanfaatan bakteri filosfer, rizosfer dan endotif asal tanaman sagu yang dapat memacu pertumbuhan dengan sifat pelarutan fosfat dan menghambat serangan patogen *Fusarium* sp. Namun, perlu dilakukan pengujian *bioassay* baik menggunakan isolat tunggal maupun konsorsium bakteri pada tanaman untuk melihat pengaruhnya terhadap tanaman uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarillis S, Bintoro MH, Lontoh AP. 2009. Aspek Pengendalian Gulma di Perkebunan Sagu (*Metroxylon Sagu* Rottb.) di PT. National Timber and Forest Product, Selat Panjang, Riau. Seminar Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB. Bogor: IPB.
- Andrews JH, Harris RF. 2000. The Ecology And Biogeography Of Microorganisms On Plant Surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:145-180.
- Baharuddin, Andi H, Danial R. 2014. Karakterisasi beberapa isolat *Xanthomonas oryzae* L (penyebab penyakit hawar daun bakteri) pada padi. Pusat Penelitian dan Pengembangan (PUSLITBANG) Bioteknologi dan Laboratorium Terpadu Universitas Hasanuddin. Hal: 1-11.
- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem.* 37: 395-412.
- Huang JS. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology.* 24, 141- 57.
- Lindow SE, Brandl M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Apl Environl Microbiol.* 69 (4):1875-1883.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2000. Brock Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice-Hall. International Edition.
- Purwanto UMS, Pasaribu FH, Bintang M. 2014. Isolasi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*Piper betle*.L) dan potensinya sebagai penghasil senyawa antibakteri. *Current biochemistri.* 1(1): 51-57.
- Ryu CM. 2003. Bacterial volatile promote growth in arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.* 100: 4927-2894.
- Widodo. 2006. Peran Mikroba Bermanfaat dalam Pengelolaan Terpadu Hama dan Penyakit Tanaman. Makalah disampaikan pada Apresiasi Penanggulangan Tanaman Sayuran, Nganjuk 3-6 Oktober 2006.
- Widyati E. 2013. Memahami Interaksi Tanaman – Mikroba. *Tekno Hutan Tanaman.* 6(1): 13-20

KESIMPULAN

Isolasi bakteri yang berinteraksi dengan tanaman sagu berhasil dilakukan dengan menghasilkan 34 isolat sebagai bakteri endofit, filosfer dan rizosfer.

Sebagian besar bakteri tidak tergolong sebagai patogen pada manusia, hewan atau tanaman. Terdapat 8 isolat bakteri yang memiliki kemampuan sebagai bakteri pelarut fosfat. Bakteri filoster dengan kode isolat 21 memiliki kemampuan penghambatan terbesar yaitu 40% terhadap patogen *Fusarium* sp. yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pengendali hayati.