

Briquette Characteristics of Mixed Charcoal of Taro Peel and Rice Husk

Galu Murdikaningrum, Mutiara Putri Utami Susanto, Raden Tarisa Nurhanifah, Mualifah (pp:126–136)

Analysis of Interest In Using Electrical Bicycles in Palangka Raya

Vivien Nopella Valentina, Robby, Sutan Parasian Silitonga (pp: 137–144)

The Effect Of H₂O₂ On The Bleaching-Scouring Simultaneous Process Of 100% Cotton Fabric With Pad – Batch System

Luciana, Agni Salamah (pp: 145–153)

Management of Water Quality Parameters In Cultivating Vaname Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) In Intensive Tambak PT. Aneka Tambak Oseana Nusantara , NTB

Pieter Amalo, Riris Yuli Velentine, Catur Pramono Adi, Restye Putri Geofani Mbura (pp: 154–162)

Analysis of The Ant Number Effects on Ant Colony Optimization for Solving Russia-20-Nodes-SDVRP Instance

Ekra Sanggala, Muhammad Ardhya Bisma (pp: 163–174)

Facilities Re-layout of “X” Health Center

Dini Yulianti, Tombak Gapura Bhagya, Didi Kusvendi (pp: 175–186)

Use of Gold Mine Waste Sand From Penda Pilang Village as Hrs-Base Mixture

Deskianto, Supiyan, Devia (pp: 187–199)

In Vitro Antagonism Test of Endophytic Isolates From The Ciplukan Plant (*Physalis Angulata L.*) Against *Ralstonia Solanacearums*

Ika Afifah Nugraheni, Inneke Ashri Mawaddah (pp: 200–210)

Employee Performance Measurement at PT. Cahaya Mekanindo Perkasa Using the Human Resources Scorecard Method

Ilyas Habibi, AuliaFashanah Hadining (pp: 211–219)

The Effect of Temperature Variations in the Pressing Process on Glossing Defects Bigborn 2-Tuck Pants Style 3651 Trousers in the Finishing Department of PT. X

Afriani Kusumadewi, Feny Nurherawati, Filly Pravitasari (pp: 220–227)

Optimum Splice Thickness Ratio Splicer of a Winding Machine to PE20KT Thread Splicing Quality

Hendri Pujiyanto, Bambang Yulianto, Hamdan S Bintang, Dinda Amelia Pramesti (pp: 228–235)

The Influence of Organizational Culture and Organizational Commitment to Employee Work Discipline at the Bandung City Transportation Service

Moch Ruli Chaerudin, Riza Rizkiah (pp: 236–245)

Feasibility Analysis of Smelter Grade Alumina (SGA) Project Development at PT. X

Dio Rianto, Dedy Setyo Oetomo, Rizky Fajar, Ramdhani (pp: 246–258)

Evaluation of Decision Making on Using Online Media in the D'Amerta Berniaga Bandung Business Group

Alam Avrianto, Ira Murwenie, Rahmina Puspa AR, Dwirani Fauzi L, Abdul Fatah H (pp: 259–265)

5 Year Effectiveness Index From Research Ministry Of Marine And Fisheries

Catur Pramono Adi, Pieter Amalo (pp: 266–273)

Technology Acceptance Model for the Use of Learning Management System in Indonesia

Graha Prakarsa, Elly Komala, Tombak Gapura Bhagya, Safira Noor Andinia (pp: 274–284)

In vitro antagonism test of endophytic isolates from the ciplukan plant (*Physalis angulata* L.) against *Ralstonia solanacearum*

Uji antagonis isolat endofit asal tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*

Ika Afifah Nugraheni^{1*)}, Inneke Ashri Mawaddah²⁾

^{1&2)} Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, 55292

Email: ikaafifah@unisayogya.ac.id

*) Corresponding author

Abstract: *Ralstonia solanacearum* was a pathogenic bacteria that causes wilt disease which can cause up to one hundred percent damage to horticultural plants. Therefore, a control effort was needed to overcome this problem. The use of pesticides was an alternative that can be used to suppress the growth of the pathogen *R. solanacearum*. However, its continuous use poses a high risk to the environment so friendly and safe control efforts are needed. One way was by utilizing endophytic bacteria. This study aims to test the ability of endophytic bacterial isolates from ciplukan plant (*Physalis angulata* L.) to suppress the growth of the pathogenic bacteria *R. solanacearum* in vitro. The method in this research includes rejuvenating endophytic bacterial isolates BA2(3), BA3(1), DA1(4) and BU3(5) from ciplukan plants (*Physalis angulata* L.) obtained from research conducted by Setianah (2020), observations macroscopic and microscopic endophyte isolates, hypersensitivity test of endophytic bacteria on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.), then continued with an in vitro antagonist test using the Kirby Baurer technique. Research data shows that of the four candidates, two isolates of endophytic bacteria, namely BA2(3) and BU3(5), showed a negative hypersensitivity reaction which was characterized by the absence of necrosis symptoms in the hypersensitivity test, so these isolates could be tested for antagonists. The results of the antagonist test showed that isolates BA2(3) and BU3(5) had the potential to inhibit the growth of *R. solanacearum* which had an inhibitory diameter of 3.03 mm and 1.60 mm in the first 24 hours of incubation. It is hoped that the ability of endophyte isolates BA2(3) and BU3(5) to inhibit the growth of the pathogen *R. solanacearum* can be used as a biological agent to reduce the use of pesticides in treating plant diseases..

Keywords : endophytic bacteria, ciplukan plants, necrosis, wilt disease, *R. solanacearum*

Abstrak: *Ralstonia solanacearum* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit layu yang dapat menimbulkan kerusakan pada tanaman hortikultura hingga seratus persen. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu upaya pengendalian untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penggunaan pestisida merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan patogen *R. solanacearum*. Namun, penggunaannya secara terus menerus memiliki resiko yang tinggi terhadap lingkungan sehingga diperlukan upaya pengendalian yang ramah dan aman. Salah satunya dengan memanfaatkan bakteri endofit. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan isolat bakteri endofit dari ciplukan (*Physalis angulata* L.) dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen *R. solanacearum* secara *in vitro*. Metode pada penelitian ini meliputi peremajaan isolat bakteri endofit BA2(3), BA3(1), DA1(4) dan BU3(5) dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang didapat dari penelitian yang dilakukan oleh Setianah (2020), pengamatan makroskopik dan mikroskopik isolat endofit, uji hipersensitifitas bakteri endofit pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), kemudian dilanjutkan dengan uji antagonis *in vitro* dengan teknik Kirby Baurer. Data penelitian menunjukkan jika dari empat kandidat, diperoleh dua isolat bakteri endofit yaitu BA2(3) dan BU3(5) menunjukkan reaksi negatif hipersensitif yang ditandai dengan tidak adanya gejala nekrosis pada uji hipersensitifitas, sehingga isolat tersebut dapat dilakukan pengujian antagonis. Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa isolat BA2(3) dan BU3(5) berpotensi dalam menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* yang memiliki luas diameter penghambatan sebesar 3,03 mm dan 1,60 mm pada inkubasi 24 jam pertama. Kemampuan yang dimiliki oleh isolat endofit BA2(3) dan BU3(5) dalam menghambat pertumbuhan patogen *R. solanacearum* diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai agen hayati untuk mengurangi penggunaan pestisida dalam mengatasi penyakit pada tanaman.

Kata Kunci: bakteri endofit, tanaman ciplukan, nekrosis, penyakit layu, *R. solanacearum*

DOI: <http://dx.doi.org/10.37577/sainteks.v%vi%i.607>

Received: 07, 2023. Accepted: 08, 2023.

Published: 09, 2023.

PENDAHULUAN

Sektor pertanian memiliki peran yang penting dalam menunjang sektor perekonomian dan pangan nasional. Namun, peningkatan hasil produksi pertanian masih menghadapi tantangan, antara lain adanya serangan organisme pengganggu tanaman (OPT). Salah satu OPT yang menyerang tanaman di Indonesia yaitu *R. Solanacearum*, yang menyebabkan penyakit layu tanaman (Navitasari *et al.*, 2021).

Penyakit layu tergolong jenis penyakit penting yang menyerang tanaman hortikultura di Indonesia. Menurut Geddes (1992 dalam Setiawan, 2019), penyakit oleh bakteri *R. solanacearum* menduduki peringkat ke-6 penyebab kerusakan tanaman yang ada di Indonesia. Sedangkan menurut Mansfield *et al.* (2012), patogen *R. solanacearum* menduduki peringkat ke-2 dari 10 daftar bakteri patogen tanaman dalam patologi molekuler tanaman.

Dampak kerugian yang ditimbulkan oleh bakteri patogen *R. solanacearum* mampu menimbulkan keparahan serta kerugian pada sektor pertanian hingga sebesar 100% (Elphinstone, 2005 dalam Setiawan, 2019). Gejala infeksi yang ditimbulkan tanaman apabila terinfeksi oleh *R. solanacearum* ialah terdapatnya perubahan warna pada akar dan batang tanaman menjadi berwarna kuning kecoklatan, serta menunjukkan gejala layu pada bagian tanaman (Syukur, 2016 dalam Apriliani, 2020). Efek yang ditimbulkan dari tanaman yang terinfeksi oleh bakteri patogen *R. solanacearum* memiliki dampak yang buruk bagi tanaman dikarenakan dapat menyebabkan kematian pada tanaman (Setyari *et al.*, 2013).

Berbagai upaya yang telah dilakukan para petani dalam melakukan pengendalian infeksi patogen *R. solanacearum* ialah dengan menggunakan pestisida. Pestisida lebih sering digunakan karena jauh lebih mudah didapatkan serta dapat mengurangi infeksi patogen secara instan. Akan tetapi penggunaan pestisida yang terus-menerus serta melebihi dosis penggunaan menyebabkan resistensi terhadap patogen serta lingkungan (Nababan *et al.*, 2017). Oleh karena itu dibutuhkan upaya pengendalian hayati terhadap patogen *R. solanacearum* yang ramah bagi lingkungan dan aman bagi lingkungan maupun kehidupan manusia.

Upaya pengendalian hayati yang ramah lingkungan dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri endofit sebagai agen pengendali patogen tanaman. Bakteri endofit hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif pada tanaman (Desriani *et al.*, 2014), serta dapat memberikan keuntungan terhadap tanaman inang dan lingkungan. Penelitian terdahulu telah memanfaatkan bakteri endofit tanaman sebagai pengendali hayati *R. Solanacearum*. Salah satunya ialah penelitian Zahra *et al.* (2019) yang memperoleh isolat bakteri endofit asal tanaman terung (*Solanum melongena* L.), memiliki kemampuan untuk menghambat *R. solanacearum* secara *in vitro*.

Sejauh ini, penelitian terdahulu telah melakukan pemanfaatan bakteri endofit dari jenis tanaman lain, sehingga belum terdapat penelitian yang memanfaatkan bakteri endofit ciplukan (*Physalis angulata* L.) sebagai agen pengendali bakteri patogen *R. solanacearum*. Padahal bakteri endofit tanaman ciplukan memiliki potensi antimikroba untuk dalam penghambatan patogen. Setianah (2020) telah berhasil mengisolasi 44 bakteri endofit dari ciplukan dan didapatkan empat bakteri yang memiliki diameter penghambatan terluas terhadap patogen *P. aureginosa*, *E. coli*, dan *S. aureus*. yaitu isolat BA2(3), BA3(1), DA1(4), dan BU3(5) Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan bakteri endofit dari tanaman ciplukan sebagai agen hayati dalam menghambat patogen tanaman *R. solanacearum* secara *in vitro*.

METODOLOGI

Subjek Penelitian

Penelitian ini tergolong penelitian eksperimental menggunakan empat bakteri endofit dari ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang berasal dari penelitian sebelumnya (Setianah, 2020). Bakteri endofit yang digunakan yaitu isolat BA2(3), BA3(1), DA1(4), dan BU3(5).

Alat dan Bahan

Alat penelitian yang digunakan meliputi autoklaf, spektrofotometer, sentrifugasi, *drigalskispatula*, jarum ose, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, *beaker glass*, timbangan analitik, pinset, penggaris, kapas, jangka sorong digital, tisu, *aluminium foil*, *plastic wrap*, *hotplate*, *hand couter*, bunsen api, *tube*, *vortex*, tabung reaksi, *laminar air flow*, *rotator shaker*, *sput*, kertas label, pelubang kertas, kertas saring.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient broth* (NB), akuades steril, empat isolat bakteri endofit tanaman ciplukan yaitu isolat BA2(3), BA3(1), DA1(4), dan BU3(5), tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), bakterisida/fungisida Nordox 56WP, alkohol 70%, Bakteri patogen *R. solanacearum* yang berasal dari Laboratorium Bakteri di Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Universitas Gajah Mada.

Peremajaan Isolat Bakteri Endofit Tanaman Ciplukan

Bakteri endofit tanaman ciplukan yang digunakan merupakan isolat endofit yang diperoleh dari hasil penelitian terdahulu Empat isolat kandidat bakteri endofit terpilih dengan kode BA2(3), BA3(1), DA1(4), dan BU3(5) dilakukan peremajaan untuk selanjutnya dilakukan pengamatan mikroskopik dan pengamatan makroskopik. Peremajaan bakteri endofit dimulai dengan mengambil biakan murni dari kultur *stock* sebanyak satu ose, kemudian ditumbuhkan pada permukaan media NA dengan cara digoreskan secara zig zag (*streak*). Selanjutnya, bakteri diinkubasi pada suhu 37°C dalam waktu 24 jam (Yani *et al.*, 2019).

Peremajaan Bakteri Patogen *R. solanacearum*

Bakteri patogen *R. solanacearum* diperoleh dari Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada. Bakteri patogen tersebut selanjutnya dilakukan peremajaan. Proses peremajaan dilakukan dengan cara mengambil satu jarum ose biakan isolat endofit murni kemudian digoreskan pada permukaan petridish yang berisikan media NA untuk selanjutnya diinkubasi selama 24 – 48.

Uji Hipersensitifitas Bakteri Endofit

Uji hipersensitifitas dilakukan dengan menggunakan daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). Empat isolat kandidat bakteri endofit BA2(3), BA3(1), DA1(4), dan BU3(5) yang sudah diremajakan, selanjutnya dilakukan pengambilan isolat tunggal pada masing-masing bakteri endofit, kemudian disuspensikan ke dalam akuades steril sebanyak 5 mL dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri menggunakan panjang gelombang sebesar 625 nm, nilai absorbansi antara 0,08 sampai 0,130 sehingga diperoleh kerapatan bakteri yang setara standar kekeruhan McFarland 0,5. Setiap suspensi bakteri endofit tersebut diambil menggunakan spuit steril sebanyak ± 2 mL untuk selanjutnya dilakukan injeksi pada bagian belakang daun tanaman tembakau, perlakuan injeksi pada setiap isolat diulang sebanyak 3 kali (Munif *et al.*, 2015). Kontrol negatif diinjeksi dengan akuades steril sedangkan kontrol positif menggunakan patogen *R. solanacearum*. Selanjutnya, perlakuan tersebut diamati selama 48 jam (Arimbawa *et al.*, 2019). Hasil positif uji hipersensitivitas ditunjukkan dengan munculnya gejala nekrosis pada daun, sebaliknya uji negatif tidak memunculkan nekrosis.

Uji Antagonis Bakteri Endofit Terhadap *R. solanacearum*

Pembuatan suspensi bakteri Patogen *R. solanacearum*

Patogen *R. solanacearum* ditumbuhkan dalam media NB 10 mL selama 72 jam pada suhu $\pm 36^{\circ}\text{C}$. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri menggunakan spektrofotometri 625 nm hingga mencapai nilai absorbansi antara 0,080 sampai 0,130 yang setara McFarland 0,5 (10^8 CFU/mL) (Cockerill *et al.*, 2012 dengan modifikasi).

Pembuatan Suspensi Bakteri Endofit

Kandidat isolat bakteri endofit dengan hasil uji negatif hipersensitivitas diremajakan dalam media NB. Inkubasi dilakukan dalam *rotator shaker* selama 72 jam. Suspensi bakteri endofit yang sudah ditumbuhkan, kemudian diukur kepadatannya menggunakan spektrofotometer 625 nm yang setara McFarland 0,5. Suspensi dipindahkan ke dalam *tube* dan dilakukan sentrifugasi 20 menit kecepatan 3000 rpm (Aqlinia *et al.*, 2020), sehingga akan diperoleh larutan supernatan dan biomassa pada *tube*.

Uji Antagonis

Uji antagonis dilakukan menggunakan teknik *Kirby Bauer*. Suspensi *R. solanacearum* diambil sebanyak 100 μL dan diratakan pada media NA menggunakan *drigalskispatala*. Petri kemudian dibagi 4 bagian yang digunakan untuk kontrol positif, kontrol negatif, bakteri endofit 1, dan bakteri endofit 2. Kertas saring dengan diameter ± 6 mm diletakkan di atas media NA yang sudah ditumbuhkan bakteri patogen *R. solanacearum* yang kemudian masing-masing dari kertas saring ditetesi oleh supernatan bakteri endofit sebanyak 50 μL . Perlakuan uji diulang sebanyak 3 kali. Untuk kontrol negatif digunakan media NB serta akuades steril dan untuk kontrol positif menggunakan bakterisida Nordox 56 WP dengan konsentrasi 0,5% (Yanuar., 2016). Kemudian petri disimpan selama 24-96 jam dalam suhu $\pm 36^{\circ}\text{C}$ untuk selanjutnya diamati dan diukur menggunakan jangka sorong terhadap terbentuknya zona penghambatan yang dihasilkan (Oktafiyanto *et al.*, 2018).

Pengukuran Diameter Zona Hambat dan Analisis Data

Apabila terdapat zona penghambatan (zona bening) terbentuk pada sekeliling kertas saring, maka diukur diameter penghambatan (zona bening) dengan jangka sorong menggunakan rumus Kategori Hambatan Minimum (KHM) (Pratiwi, 2017). Data hasil pengujian selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata (*means*) sehingga mendapatkan grafik zona hambat yang terbentuk dari setiap isolat endofit.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Bakteri endofit dalam penelitian ini merupakan isolat bakteri yang diperoleh dari hasil penelitian Setianah (2020). Tanaman ciplukan dipilih sebagai sumber bakteri endofit dikarenakan tanaman ciplukan banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat (Setianah, 2020). Selain itu, tanaman ciplukan memiliki senyawa bioaktif berupa saponin, alkaloid, flavonoid, tanin, dan polipenol yang mampu memiliki aktivitas antimikroba (Mahardika *et al.*, 2021)

Empat isolat endofit yang terpilih dilakukan *re-culture* dan diinkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan isolat ditandai dengan peningkatan masa sel sehingga terbentuknya koloni baru (Retnowati *et al.*, 2011 dalam Setianah, 2020). Isolat endofit yang sudah di *re-culture* selanjutnya dilakukan pengamatan makroskopik (warna, tepian, bentuk, dan elevasi koloni) dan mikroskopik (pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk isolat) untuk dibandingkan dengan hasil data karakterisasi terdahulu. Tujuan dari pengamatan isolat endofit ialah untuk melihat serta mengetahui pertumbuhan morfologi isolat bakteri yang terbentuk, guna untuk menghindari adanya kontaminasi pada isolat endofit.

Tabel 1. Ciri morfologi isolat bakteri endofit ciplukan

No	Kode Isolat	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Elevasi Koloni	Tepian Koloni
1	BA2(3)	Oranye	Bulat	Cembung	Mulus
2	BA3(1)	Kuning	Bulat	Cembung	Mulus
3	DA1(4)	Krem	Bulat	Cembung	Mulus
4	BU3(5)	Kuning	Bulat	Cembung	Mulus

Hasil karakterisasi makroskopik yang ditampilkan pada Tabel 1 menunjukkan isolat BA3(1) dan isolat BU3(5) memiliki bentuk bulat, elevasi cembung, tepian mulus, dan koloni berwarna kuning. Isolat BA2(3) memiliki bentuk bulat, elevasi cembung, tepian mulus, dan koloni berwarna oranye. Isolat DA1(4) memiliki bentuk bulat, elevasi cembung, tepian mulus, dan koloni berwarna krem. Berdasarkan hasil pengamatan makroskopik pada isolat bakteri endofit menunjukkan hasil karakterisasi yang sama dari hasil karakterisasi sebelumnya baik dari pengamatan warna, tepian, bentuk, dan elevasi koloni.

Hasil pengamatan morfologi isolat endofit secara mikroskopik dilakukan pewarnaan Gram pada setiap isolat endofit yang nantinya akan dibandingkan dengan hasil data pengamatan mikroskopik terdahulu. Menurut Hajar (2012), pewarnaan Gram bertujuan mengetahui ciri morfologi suatu bakteri beserta dengan sifatnya berdasarkan uji Gram. Hasil dari karakterisasi mikroskopik, menunjukkan kesamaan sifat Gram dan bentuk sel dengan hasil karakterisasi mikroskopik pada penelitian terdahulu. Empat isolat endofit yang terpilih terdapat dua bakteri Gram positif berbentuk *coccus*, yaitu BA2(3) dan DA1(4) kemudian dua bakteri lainnya yaitu, BA3(1) dan BU3(5) termasuk dalam kelompok Gram negatif dan berbentuk *coccus*. Hasil pewarnaan Gram serta pengamatan bentuk isolat disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk isolat endofit

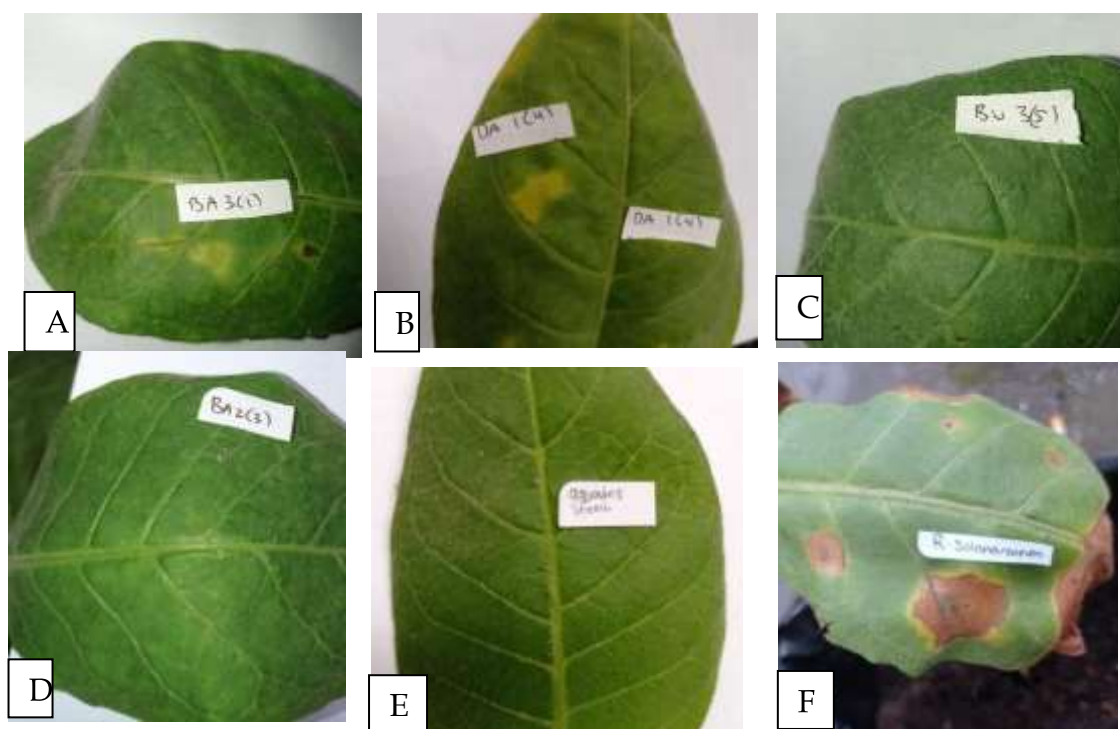
No	Kode Isolat	Bentuk sel	Sifat Gram
1	BA2(3)	<i>Coccus</i>	Gram Positif
2	DA1(4)	<i>Coccus</i>	Gram Positif
3	BA3(1)	<i>Coccus</i>	Gram Negatif
4	BU3(5)	<i>Coccus</i>	Gram Negatif

Berdasarkan hasil perwarnaan Gram pada isolat endofit, didapatkan dua isolat bersifat Gram positif dengan visualisasi sel berwarna ungu, serta dua isolat endofit lainnya bersifat Gram negatif dengan sel berwarna pink kemerahan. Perbedaan warna pada hasil pewarnaan Gram dikarenakan terdapat perbedaan senyawa penyusun antara dinding sel bakteri Gram negatif dengan Gram positif. Hal ini sesuai dengan penjelasan Wulandari dan Desi (2019), yang menjelaskan bahwa bakteri Gram positif mampu mempertahankan cat kristal violet. Hal ini dikarenakan penyusun dinding sel pada bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. Bakteri Gram negatif tidak memiliki kemampuan untuk dapat mempertahankan warna kristal violet dikarenakan tipisnya peptidoglikan.

Selain itu, dinding sel Gram positif memiliki sifat tidak dapat larut dalam aseton, sehingga pewarnaan kristal violet mampu tetap dipertahankan oleh sel dan dapat memberikan visualisasi sel yang berwarna ungu kebiruan. Dinding sel Gram negatif dapat larut dalam aseton, sehingga visualisasi sel berwarna merah. Hal tersebut dikarenakan cat Gram berupa safranin masih dipertahankan sel (Rohmah, 2017). Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik isolat endofit menunjukkan hasil karakterisasi yang sama dari hasil karakterisasi sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa isolat endofit tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme lain sehingga kandidat isolat endofit terpilih dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya yaitu uji hipersensitifitas..

Uji hipersensitifitas dilakukan untuk mengetahui apakah ke-empat isolat bakteri endofit yang terpilih bersifat patogen terhadap tanaman yang ditandai dengan adanya gejala nekrosis. Uji hipersensitifitas dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri uji pada daun tanaman tembakau. Tanaman tembakau digunakan dalam uji hipersensitifitas dikarenakan merupakan tanaman yang sensitif akan hama serta penyakit (Fajarika *et al.*, 2022). Selain itu, tanaman tembakau banyak digunakan sebagai parameter untuk mengetahui patogensitas isolat mikroba terhadap tanaman dikarenakan tanaman tembakau memiliki respon yang cepat terhadap terjadinya reaksi hipersensitif (Herdiyantoro *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil pengujian hipersensitifitas terhadap empat isolat endofit yang telah diinokulasikan ke daun tembakau (Tabel 3), terdapat dua isolat bakteri yaitu BA3(1) dan DA1(4) menunjukkan reaksi hipersensitif yang ditandai dengan adanya gejala nekrosis pada permukaan daun tembakau yang telah diinokulasikan bakteri endofit. Reaksi negatif hipersensitif ditunjukkan oleh isolat BA2(3) dan BU3(5) yang, tidak terdapat adanya bercak kuning pada tanaman tembakau. Kontrol positif (*R. solanacearum*) menunjukkan terdapatnya reaksi hipersensitif yang ditandai dengan adanya nekrosis, kemudian pada kontrol negatif (akuades steril) tidak menunjukkan timbulnya bercak nekrosis pada titik inokulasi isolat di daun tanaman tembakau (Gambar 1)



Gambar 1. Reaksi hipersensitif pada daun tembakau yang telah diinokulasikan bakteri uji pada 48 jam setelah inokulasi, (A) isolat BA3(1), (B) Isolat DA1(4), (C) Isolat BA2(3), (D) Isolat BA2(3), (E) kontrol negatif dan (F) kontrol positif.

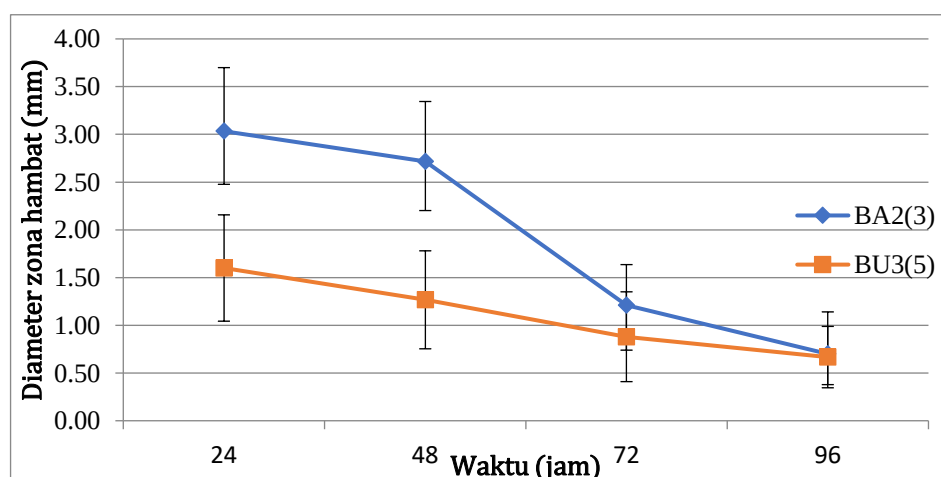
Tingkat keparahan isolat bakteri pada uji hipersensitif, dipengaruhi oleh luasnya bercak diameter nekrosis yang terbentuk. Hasil ini sesuai dengan Chung *et al* (2011), yang menjelaskan tingkat keparahan uji patogensitas berdasarkan bercak nekrosis yang terbentuk. Pada hasil penelitian, isolat BA2(3) dan BU3(5) tidak terdapat bercak nekrosis sehingga isolat tersebut tidak berpotensi sebagai patogen terhadap tanaman, sedangkan Isolat BA3(1) dan isolat DA1(4) memiliki luas bercak nekrosis yang lebih kecil dibandingkan pada kontrol positif. Kontrol positif memiliki bercak nekrosis yang lebih lebar, berwarna coklat serta mengering. Oleh karena itu,

tingkat keparahan patogensitas tertingi pada uji hipersensitifitas ditunjukkan oleh daun yang telah diinokulasi isolat patogen *R. solanacearum*.

Bakteri endofit ataupun bakteri patogen lainnya memiliki faktor virulensi terhadap pertahanan tumbuhan, sehingga mikroorganisme endofit berpeluang memiliki sifat patogenitas laten atau tersembunyi, oleh karena itu dibutuhkan rangsangan atau uji tertentu untuk menimbulkan respon patogensitasnya terhadap tanaman (Kumala, 2019). Houdenat dan Isabelle (2017) menjelaskan, respon pertahanan yang ditimbulkan tanaman dipicu oleh adanya interaksi gen Avr (Avirulen) yang dimiliki oleh patogen terhadap gen R (resisten) tanaman. Pertahanan tersebut disebut dengan *gene for gene interaction*. Apabila gen R yang dimiliki oleh tanaman mampu mengkode reseptor spesifik dan mengenali kode produk protein dari Avr patogen, maka akan terjadi induksi ekspresi gen ketahanan yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Sehingga menimbulkan reaksi hipersensitif yang ditandai dengan timbulnya bercak nekrosis pada tanaman.

Isolat endofit yang telah menunjukkan reaksi negatif pada uji hipersensitifitas selanjutnya dilakukan pengujian antagonis terhadap patogen *R. solanacearum* secara *in vitro*. Dalam hasil uji hipersensitifitas, isolat endofit BA2(3) dan isolat BU3(5) merupakan isolat yang tidak menunjukkan reaksi hipersensitif positif. Suspensi isolat endofit yang digunakan dalam uji antagonis merupakan suspensi yang telah diinkubasi selama 72 jam. Alasan menggunakan suspensi dengan waktu inkubasi 72 jam, dikarenakan isolat endofit BA2(3) dan isolat BU3(5) sudah memasuki fase stasioner. Hasil ini selaras dengan penelitian yang sedang berjalan bahwa isolat endofit tersebut memasuki fase stasioner pada waktu 72 jam dengan nilai absorbansi pertumbuhan sebesar 0,829 A. Pengujian dilakukan secara triplo untuk masing-masing isolat endofit sehingga diameter zona hambat yang didapatkan diperoleh dari rata-rata hasil perhitungan triplo tersebut. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan setiap 24 jam selama 4 hari (96 jam) sehingga didapatkan grafik pertumbuhan zona hambat.

Hasil yang diperoleh dari uji antagonis isolat endofit terhadap *R. solanacearum* menunjukkan bahwa isolat BA2(3) dan BU3(5) berpotensi memiliki aktivitas penghambatan patogen dengan diameter zona bening bervariasi (Gambar 2). Pada isolat endofit BA2(3) memiliki luas diameter penghambatan terluas pada inkubasi 24 jam pertama sebesar 3,03 mm, dan isolat endofit BU3(5) memiliki luasan diameter penghambatan terluas pada inkubasi 24 jam pertama sebesar 1,60 mm. Pada 48 jam selanjutnya, masing-masing isolat BA2(3) dan BU3(5) mengalami penurunan diameter zona hambat hingga mencapai penurunan luas diameter sebesar 0,67 mm untuk BU3(5) dan 0,70 mm untuk isolat BA2(3) selama pengamatan 96 jam.

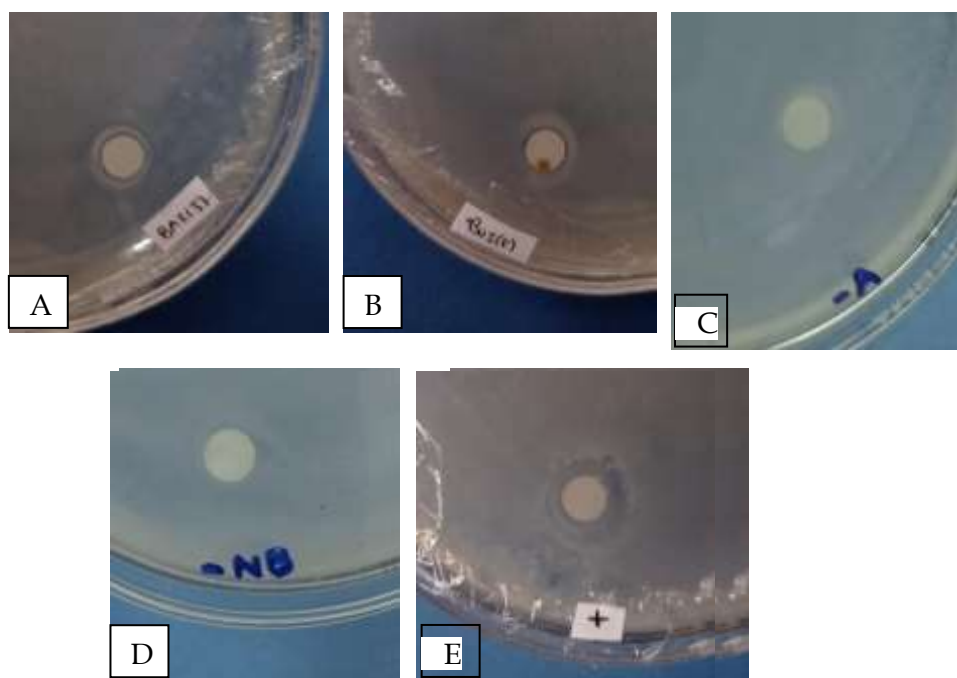


Gambar 2. Grafik uji antagonis bakteri endofit terhadap *R. solanacearum*

Adanya penurunan diameter penghambatan pada media pertumbuhan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Pada waktu inkubasi di 24 jam pertama, kondisi media pertumbuhan, kondisi inkubasi, serta sensitivitas organisme semuanya masih dalam keadaan optimal sehingga didapatkan diameter zona penghambatan tertinggi. Pada inkubasi 48 hingga 96 jam, terjadi penurunan diameter zona hambat, hal ini dikarenakan terdapatnya faktor yang mempengaruhi penurunan diameter zona hambat. Ariyanti (2012) menyebutkan, faktor yang memungkinkan penyebab terjadinya perbedaan diameter zona hambat yaitu kondisi medium kultur, pH, komposisi media, suhu inkubasi, serta waktu inkubasi.

Berdasarkan luasan diameter zona hambat yang terbentuk, isolat BA2(3) dan isolat BU3(5) memiliki kategori aktivitas penghambatan lemah dikarenakan diameter zona hambat yang terbentuk dalam uji antagonis berukuran <5 mm. Desriani *et al.* (2014) menjelaskan bahwa lemahnya aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri endofit dimungkinkan karena bakteri endofit hanya mampu berinteraksi dan menghasilkan senyawa antibakteri secara langsung dengan tanaman inang. Hal tersebut mengakibatkan aktivitas kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan senyawa anti bakteri menurun.

Penghambatan yang terbentuk antara bakteri endofit terhadap *R. solanacearum* pada uji antagonis ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar kertas saring atau kertas cakram. Menurut Zahra (2019), keefektifan hasil uji antagonis secara *in vitro* didasarkan pada terbentuk atau tidaknya zona hambat antara patogen dan agen antagonis. Terdapatnya zona hambat tersebut dikarenakan terdapatnya potensi endofit yang mampu mengendalikan, menghambat, bahkan membunuh pertumbuhan patogen melalui mekanisme antibiosis (Deswanti, 2021). Antibiosis merupakan mekanisme pertahanan bakteri antagonis yang mampu menghambat pertumbuhan morfologis maupun fisiologis dari mikroorganisme lain dengan mensekresikan metabolit sekunder berupa antibiotik seperti enzim pelisis, siderofor dan substansi toksik lainnya (Prihatinningsih *et al.*, 2015).



Gambar 6. Diameter zona hambat isolat bakteri endofit terhadap *R. Solanacearum*, Isolat BA2(3), (B) isolat BU3(5), (C) kontrol negatif (akuades steril), (D) kontrol negatif (NB), (E) kontrol positif (Bakterisida / fungisida Nordox 56 WP)

Pada saat bakteri endofit memasuki fase stasioner, maka nutrisi pada media akan terbatas atau habis sehingga bakteri akan mensintesis metabolit sekunder (Pratiwi, 2008). Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang digunakan sebagai sarana dalam penyokong pertumbuhan, perkembangan, dan pertahanan (Asmara, 2017). Metabolit sekunder diproduksi melalui proses biosintesis pada tumbuhan. Selain menjadi sumber nutrisi, metabolit sekunder juga digunakan bakteri endofit sebagai sebagai agens biokontrol yang bersifat antimikroba (Juwita, 2010).

Kemampuan isolat endofit BA2(3) dan BU3(5) dalam menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*, diharapkan dapat dimanfaatkan serta diaplikasikan sebagai agen hayati untuk menanggulangi penyakit tanaman dan dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengurangi penggunaan pestisida dalam mengatasi penyakit pada tanaman. Menurut Wahyuni *et al.* (2022), penggunaan agen hayati untuk mengatasi penyakit tanaman memiliki beberapa keunggulan dibandingkan penggunaan pestisida kimia. Keunggulan tersebut antara lain aman dan tidak meninggalkan residu bagi lingkungan, serta bersifat berkelanjutan sehingga penggunaan yang berulang-ulang tidak berbahaya bagi lingkungan dan makhluk hidup.

SIMPULAN

Penelitian ini diperoleh hasil bahwa dari empat kandidat isolat bakteri endofit, diperoleh dua isolat bakteri non patogen yang menunjukkan reaksi negatif hipersensitif pada uji hipersensitifitas yaitu isolat BA2(3) dan BU3(5). Sehingga dua isolat tersebut dapat dilakukan uji antagonis. Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa isolat BA2(3) dan BU3(5) memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* secara *in vitro* dengan luas diameter zona penghambatan sebesar 3,03 mm dan 1,60 mm pada inkubasi 24 jam pertama.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriliani, S. (2020). Identifikasi biovar *Ralstonia solanacearum* penyebab layu semu pada tanaman cabai rawit di Kabupaten Banyuwangi serta pemanfaatannya sebagai poster. *Skripsi*. Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan. Universitas Jember. Jawa Timur.
- Aqlinia, M., Sri, P. dan Wijanarka. (2020). Isolasi bakteri endofit bangle (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) dan uji antibakteri supernatan crude metabolit sekunder isolat potensial terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Akademika Biologi*, 9 (1): 23-31
- Arimbawa, I. M., Gusti, N. A. S. W., I Made, S dan I Made, W. Isolasi dan seleksi bakteri antagonis untuk pengendalian penyakit busuk batang panili (*Vanilla planifolia* Andrews). *Jurnal Agroteknologi Tropika*, 8(2).
- Ariyanti, N. K., Ida, B. G. D dan Sang, K. S. (2012). Daya hambat ekstrak kulit daun lidah buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, XVI (1): 1-4.
- Chung, W. C., Chen, L. W., Huang, J. H., Huang, H. C dan Chung, W. H. (2011). A new "forma specialis" of fusarium solani causing leaf yellowing of phalaenopsis. *Plant Pathology*, 60 (2), 244-252.
- Cockerill III, F. R., Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. A., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., Hardy, D. J., Hecht, D. w., Hindler, J. A., Patel, J. B., Powell, M., Swenson, J.M., Thomson Jr, R.B., Traczewski, M.A., Turnidge, J. D., Weinstein, M. P. dan Zimmer, B. L. (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility Tests ; Approved Standard- eleventh Edition. *CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32 (1), M02-A11.
- Desriani., Ukhraida, M. S. P., Maria, B., Akhmad, R. dan Puspita, L. (2014). Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit dari tanaman binahong dan katepeng china. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3 (2), 89-93.
- Deswanti, C. H. (2021). Isolasi dan uji antagonis khamir dari tanaman pala (*Myristica fragrans* Houtt.) terhadap *Aspergillus flavus* penghasil aflatoksin. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.Jakarta.

- Fajarika, R., Taufiq, H., Hanny, H. N., Novrizza, S dan Jajang, S. (2022). Isolasi *Pseudomonas* sp. untuk pengendalian biologi terhadap layu bakteri. *Jurnal Agroteknologi dan Sains*, 6 (2), 106-114.
- Hajar, D. (2012). Isolasi, identifikasi, dan analisis kemampuan degradasi hidrokarbon bakteri tanah sampel b, cilegon, banten. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Departemen Biologi Universitas Indonesia. Depok
- Herdiyantiro, D., Mieke, R, S dan Tualar, S. (2022). Reaksi hipersensitif daun tembakau oleh isolat bakteri pelarut kalium pada praformulasi pupuk hayati. *Soilrens*, 20(2).
- Houdenat, Y. P dan Isabelle, F. (2017). Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance managment. *frontiers in plant science*.doi: 10.3389/fpls.2017.01072.
- Juwita. (2010). Potensi bakteri endofit dalam meningkatkan ketahanan tanaman kentang (*Solanum tuberosum*) terhadap seranga nematoda sista kuning (*Globodera rostochiensis*). *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Kumala, Shirly. (2019). Mikroba endofit 2: pemanfaatan mikroba endofit dalam bidang farmasi. Jakarta Barat. PT. ISFI.
- Mahardika, W. A., Rukmi, M. G. I dan Sri P. (2021). Isolasi kapang endofit (*Physalis angulata* L) dan potensi antibakteri terhadap *Escherechia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Tropical Biology*, 4(1): 33-39.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G dan Foster, G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614–629.
- Munif, A., Arif, R.W dan Elis, N.H. (2015). Bakteri Endofit dari Tanaman Kehutanan Sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman Tomat dan Agens Pengendali *Meloidogyne* sp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 11 (6),179-186.
- Nababan, C. P dan Suswati dan Syahbudin, H. (2017). Efektivitas penggunaan biofumigan limbah brassica terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum* ras 3) pada tanaman kentang di Pematang Silima Huta Kabupaten Simalungun. *Agrotekna*, 2 (1), 56-64.
- Navitasari, L., Tri, J dan Triwidodo, A. (2021). Pengaruh tomat sambung pada intensitas penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*), komponen hasil produksi, dan kualitas buah. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 26 (3), 413- 420
- Oktafiyanto, M.F., Abdul, M dan Kikin, H.M. (2018). Aktivitas antagonis bakteri endofit asal mangrove terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Meloidogyne* spp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 14 (1), 23-29.
- Pratiwi, R. H. (2017). Mekanisme pertahanan bakteri patogen terhadap antibiotik. *Journal Pro-Life*, 4 (3), 418-429.
- Prihatiningsih, N., Triwidodo, A., Bambang, H dan Jaka, W. (2015). Mekanisme antibiosis *Bacillus subtilis* B315 untuk pengendalian penyakit layu bakteri kentang. *Jurnal HPT Tropika*, 15 (1), 64-71.
- Rohmah, S. N. (2017). Isolasi dan identifikasi bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi timbal (Pb) dari lumpur lapindo. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. Jurusan Biologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Setianah, H. (2020). Isolasi bakteri endofit dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) berpotensi sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri patogen. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta. Yogyakarta
- Setiawan, A. W. (2019). Epidemiologi penyakit layu bakteri dan perkembangan kompleks spesies *Ralstonia solanacearum*. *Jurnal Galung Tropika*, 8 (3), 243-270.
- Setyari, A. R., Luqman, Q.A dan Abdul, L.A. (2013). Pengaruh pemberian pupuk cair terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Jurnal HPT*, 1 (2), 80-87.

- Wahyuni, S., Nomi, N., Leni, H. (2022). Seleksi uji antagonis bakteri dan jamur endofit dari patogen tanaman karet. *Education Science & Technology*, 5(2): 524-539.
- Wulandari, D dan Desi, P. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculanta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 6(2): ISSN 2548-611X.
- Yani, R. B., Anthoni, A dan Feskaharny, A. (2019). Pengaruh pH dan suhu terhadap produksi antibiotika dari isolat bakteri endofitik pada tumbuhan andalas (*Morus macroura* Miq.). *Jurnal Metamorfosa*, 6 (1), 90-96.
- Yanuar, A. (2016). Potensi agens hayati dalam menekan perkembangan penyakit hawar daun bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Jember. Jawa Timur.
- Zahra, D. A., Arika, P dan Herry, N. (2019). Seleksi bakteri endofit asal tanaman terung (*Solanum melongena* L) terhadap *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*. *Seminar nasional dies natalis UNS ke-43*, 3(1).