

## Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*)

Tuti Maristo Purba<sup>1</sup>, Saryono<sup>2</sup>, dan Fifi Puspita<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswi Program Studi S1Kimia, FMIPA, Universitas Riau

<sup>2</sup>Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Riau

<sup>3</sup>Jurusan Agroteknologi, FAPERTA, Universitas Riau

Kampus Binawidya Panam, Pekanbaru 28293

E-mail: marys\_poerba@yahoo.com

### Abstract

Seven endophytic bacterial isolates were isolated from dahlia tubers from Padang Panjang, West Sumatera and Saribudolok district, North Sumatera. Endophytic bacteria were isolated on nutrient agar added with ketoconazole 0.3g/100ml to inhibit the fungal growth. Endophytic bacteria were characterized by macroscopic, microscopic and also biochemical test. Morphologically, two isolates were gram positive and five isolates were gram negative. Biochemical test showed that six isolates were catalase positive, six isolate were amylase positive and five isolates were inulinase positive. Seven endophytic bacterial isolates were identified as *Bacillus coagulans* LBKURCC58, *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC59, *Acinetobacter antratus* LBKURCC60, *Bacillus pantothenicus* LBKURCC61, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LBKURCC62, *Alcaligenes faecalis* LBKURCC63 and *Alcaligenes odorans* LBKUR-CC64.

Keywords: *Bacteria*, *Dahlia variabilis*, *Endophytic*

### 1. Pendahuluan

Tanaman dahlia diketahui mengandung metabolit sekunder yaitu senyawa fenolik dan flavonoid yang telah dikaji melalui uji fitokimia. Senyawa ini dapat berperan sebagai antimikroba (Suryadi, 2007). Ekstrak etanol umbi dahlia juga telah dikaji dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Randiska, 2010). Namun, untuk mengestraksi senyawa metabolit sekunder dari umbi tanaman dahlia memerlukan sampel tanaman dahlia dalam jumlah besar. Biomassa sampel tanaman dahlia yang terbatas dan fungsi tanaman dahlia sebagai tanaman hias menjadi kendala untuk memperoleh ekstrak metabolit sekunder tanaman ini. Jumlah sampel yang terbatas disebabkan sulitnya tanaman ini didapatkan di daerah dataran rendah serta waktu panen tanaman dahlia yang relatif lama. Secara bioteknologi masalah ini dapat diatasi dengan memanfaatkan mikroorganisme yaitu bakteri endofitik.

Bakteri endofitik merupakan sekelompok mikroorganisme yang tumbuh di dalam jaringan tumbuhan dan tidak menjadi parasit terhadap tumbuhan inangnya, dan telah terbukti bahwa mikroorganisme ini kaya akan sumber produk bioaktif alami. Kemampuan bakteri endofitik menghasilkan metabolit sekunder diduga sebagai akibat

koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam bakteri endofitik (Radji, 2005). Interaksi mutualisme diantara bakteri endofit dan tanaman inang saling menguntungkan keduanya (Pimentel, 2010). Tanaman inang memproduksi asam amino kepada bakteri endofit sebagai sumber nutrisi dan sebaliknya bakteri endofit menghasilkan senyawa bioaktif khususnya mikotoksin seperti alkaloid yang dapat meningkatkan pertahanan terhadap patogen dan meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tumbuhan melalui daerah akar, namun juga dapat melalui bunga, batang dan kotiledon. Bakteri endofitik masuk ke dalam jaringan akar secara pasif melalui luka jaringan yang disebabkan oleh mikroba parasit atau jaringan yang terbuka (stomata), dan secara aktif melalui enzim pendeградasi dinding sel tumbuhan (Schulz, 2006). Beberapa penelitian telah berhasil mengisolasi bakteri endofitik yang berasosiasi dengan tanaman *Kennedia nigricans*, *Grevillea pteridifolia*, *Rhyncholacis penicillata*, *Monstera sp.* serta rerumputan (Strobel, 2003). Bakteri endofit telah diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan termasuk pohon-pohonan (cemara dan pinus), tanaman makanan ternak (alfafa, bulir gandum, bunga cengkeh), sayur-sayuran (wortel, lobak, tomat, ubi jalar, selada, kedelai) buah-buahan (pisang, nenas, jeruk), bulir tanaman biji-bijian

(jagung, padi, gandum), dan tanaman hasil panen lainnya (kopi dan tebu) (Goryluk, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri endofitik dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi dahlia yang diperoleh dari dua lokasi yaitu Padang Panjang, Sumatera Barat dan Kota Saribudolok, Sumatera Utara, larutan etanol 70% dan 96%, larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 15% dan 3%, akuades steril, kertas saring, *nutrient agar* Merck (NA), *nutrient broth* Merck (NB), pati kentang, tepung inulin, ketokonazol (generik), kristal violet, safranin, dan lugol iodin. Alat yang digunakan adalah mikroskop Olympus, autoklaf, inkubator Hemmert, cawan petri, jarum ose, kaca objek, pisau, pipet mikro dan peralatan gelas.

### 2.2. Isolasi Bakteri Endofitik

Isolasi bakteri endofitik dilakukan dengan tahap awal yaitu sterilisasi. Umbi dahlia dibersihkan dengan air mengalir, kemudian umbi dikeringkan dengan kertas saring. Sebelum penanaman potongan jaringan umbi dahlia ke media pertumbuhan (*direct plating*) terlebih dulu dilakukan sterilisasi permukaan umbi dahlia. Umbi disterilisasi menggunakan kombinasi agen sterilisasi melalui perendaman umbi dalam larutan pensteril secara berurutan. Pertama, umbi direndam dalam larutan etanol 70% selama 2 menit, lalu direndam dalam larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 15% selama 5 menit dan direndam lagi dalam larutan etanol 70% selama 30 detik kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak dua kali untuk menghilangkan sisa alkohol kemudian umbi dikeringkan dengan kertas saring steril.

### 2.3. Uji Sterilitas Umbi

Akuades sisa bilasan terakhir pada proses sterilisasi diinokulasikan pada permukaan media *nutrient agar* yang telah ditambahkan ketokonazol 0,3gr/100ml dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Umbi dinyatakan steril jika tidak ditemukan pertumbuhan apapun pada media *nutrient agar* dan jika terdapat kontaminasi pada media *nutrient agar* setelah inkubasi maka sterilisasi permukaan umbi dahlia harus diulang dan bakteri yang tumbuh pada potongan umbi dahlia tidak dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.

### 2.4. Inkubasi Umbi Steril

Umbi yang telah steril dikeringkan dengan kertas saring lalu dipotong menjadi 3 bagian, bagian tengah dari potongan sebelumnya diambil lalu dipotong lagi menjadi 3 bagian dengan ukuran  $\pm 1$ cm kemudian masing-masing potongan diletakkan pada permukaan media *nutrient agar* (NA) yang sebelumnya telah ditambahkan ketokonazol 0,3gram/100mL (sebagai antibiotik penghambat

pertumbuhan jamur). Cawan petri yang mengandung potongan umbi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah inkubasi, maka bakteri endofitik yang tumbuh di sekitar potongan umbi kemudian diisolasi menggunakan metode gores kuadran (*streak*) untuk mendapatkan kultur murni bakteri endofitik (*pure culture*). Selanjutnya kultur murni bakteri endofitik diremajakan pada media *nutrient broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kultur murni bakteri endofitik yang telah diinkubasi kemudian disubkultur pada media *nutrient agar* (cawan petri dan agar miring) yang akan digunakan untuk tahap karakterisasi.

### 2.5. Karakterisasi Bakteri Endofitik secara Makroskopis dan Mikroskopis

Karakterisasi bakteri endofitik secara makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni isolat bakteri endofitik yang telah dimurnikan. Pengamatan morfologi dari tiap isolat bakteri endofitik dilakukan pada media padat *nutrient agar* dengan suhu inkubasi 37°C dan diamati selama 24-48 jam. Pengamatan morfologi ini meliputi warna koloni, bentuk koloni dilihat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping dan bentuk tepian koloni dilihat dari atas serta ukuran koloni. Sedangkan untuk karakterisasi mikroskopis yaitu pengamatan bentuk sel dilakukan dengan bantuan mikroskopis dan pengamatannya dilakukan bersamaan pada waktu pengamatan sifat Gram bakteri endofitik.

### 2.6. Karakterisasi Biokimia Bakteri Endofitik

#### 2.6.1. Uji katalase

Biakan murni dari agar miring (NA) diremajakan pada media *nutrient broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian biakan murni digoreskan sebanyak satu ose pada permukaan media *nutrient agar* (NA) secara aseptis lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah inkubasi, larutan  $H_2O_2$  3% sebanyak 2-3 tetes ditambahkan pada permukaan koloni bakteri endofitik. Jika terlihat adanya gelembung-gelembung pada permukaan koloni bakteri endofitik maka uji ini dinyatakan positif.

#### 2.6.2. Uji hidrolisis pati

Nutrient agar sebanyak 1,15 gr disuspensikan kedalam 50 mL akuades kemudian dipanaskan agar melarut sempurna. Sebanyak 0,5 gr pati (*starch*) dilarutkan dalam 25 mL akuades untuk membentuk suspensi. Lalu suspensi dicampur dengan larutan agar. Kemudian diencerkan hingga volumenya menjadi 100 mL lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 Psi. Selanjutnya media steril dituang ke cawan petri secara aseptis. Biakan murni dari agar miring (NA) diremajakan pada media *nutrient broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian biakan murni digoreskan sebanyak satu ose pada permukaan media *starch agar* secara aseptis lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah inkubasi, kemudian

ditambahkan beberapa tetes larutan iodine diatas permukaan koloni bakteri endofitik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar pertumbuhan koloni bakteri dan negatif jika disekeliling koloni bakteri berwarna biru kehitaman.

### 2.6.3. Uji inulinasi

Umbi dahlia dicuci bersih kemudian dikupas, lalu umbi dipotong kecil dan tipis kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C. Umbi dahlia yang sudah kering selanjutnya digiling menjadi tepung. Tepung ini digunakan sebagai media untuk uji inulinase. Tepung umbi dahlia sebanyak 1 gr dicampur dengan 100 mL aquades kemudian dipanaskan selama 25 menit, disaring dan selanjutnya ditambahkan dengan 0,15 g NaNO<sub>3</sub>; 0,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dan 1,80 g agar batang, disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit.

Biakan murni dari agar miring (NA) diremajakan pada media *nutrient broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian biakan murni digoreskan sebanyak satu ose pada permukaan media inulin secara aseptis. Lalu cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah itu ditambahkan beberapa tetes larutan iodine diatas permukaan koloni bakteri. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar pertumbuhan koloni bakteri dan negatif jika disekeliling koloni bakteri berwarna coklat kemerahan.

### 2.7. Analisis Data

Data karakterisasi bakteri endofitik secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia dianalisis dengan statistik deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri Endofitik

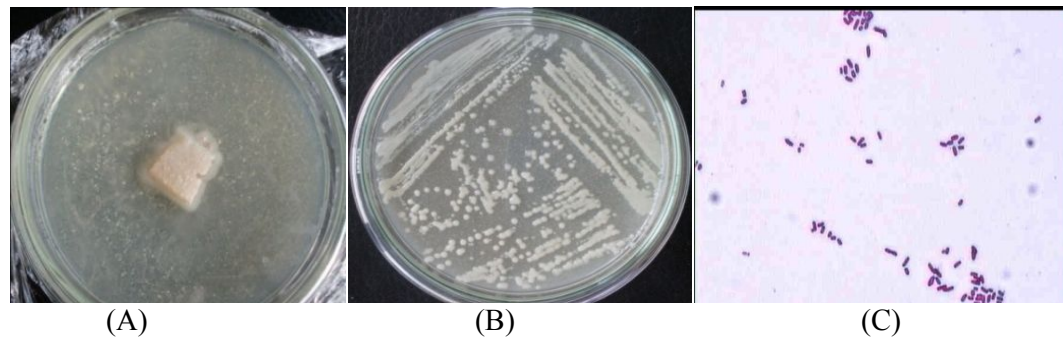
Isolasi bakteri endofitik dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) dari dua lokasi berbeda diperoleh tujuh isolat. Sebanyak lima isolat bakteri endofitik diperoleh dari daerah Padang Panjang, Sumatera Barat serta dua isolat bakteri endofitik diperoleh dari Saribudolok, Sumatera Utara.

Karakteristik morfologi koloni yaitu warna koloni merupakan karakteristik yang paling mencolok dapat diamati untuk membedakan isolat satu dengan yang lainnya. Warna koloni yang berbeda seperti yang ditunjukkan isolat LBKURCC60 berwarna kuning dikarenakan bakteri endofitik tersebut dapat menghasilkan pigmen yang berbeda. Pigmen ini merupakan metabolit sekunder yang tidak dihasilkan oleh semua bakteri tetapi hanya mikroorganisme tertentu saja. Pigmen bakteri biasanya digunakan untuk melindungi diri dari sinar UV (Schlegel, 1994).

Hasil pewarnaan Gram bakteri endofitik diperoleh dua kelompok bakteri yaitu bakteri endofitik Gram positif sebanyak dua isolat dan bakteri endofitik Gram negatif sebanyak lima isolat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1. Pengelompokan bakteri Gram positif dan Gram negatif didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri gram positif mengandung peptidoglikan yang tebal dan sedikit lipid sedangkan dinding sel bakteri gram negatif memiliki kandungan peptidoglikan yang tipis namun mengandung lipid yang tinggi. Adanya perbedaan kandungan penyusun dan besar komposisi dinding sel diantara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif mengakibatkan terjadinya perbedaan reaksi terhadap zat warna (Kristal violet dan safranin) dan larutan pemucat (alkohol 96%) yang digunakan pada proses pewarnaan Gram.

**Tabel 1.** Karakteristik makroskopis (morfologi koloni) dan mikroskopis (morfologi sel) bakteri endofitik yang diisolasi dari umbi dahlia

No	*Kode isolat	Karakteristik makroskopis bakteri endofitik					Karakteristik mikroskopis bakteri endofitik	
		Permukaan	Tepian	Bentuk	Diameter	Warna	Gram	Bentuk sel
1	LBKURCC58	Cembung	Rata	Bulat	Kecil	Putih	+	batang
2	LBKURCC59	Cembung	Rata	Bulat	Kecil	Kuning	-	batang
3	LBKURCC60	Cembung	Rata	Bulat	Kecil	Putih	-	batang
4	LBKURCC61	Cembung	Rata	Bulat	Kecil	Putih	+	batang
5	LBKURCC62	Datar	Berbenang	Berbenang	Besar	Putih	-	batang
6	LBKURCC63	Cembung	Rata	Bulat	Kecil	krem	-	batang
7	LBKURCC64	Cembung	Rata	Bulat	kecil	Putih kekuningan	-	batang

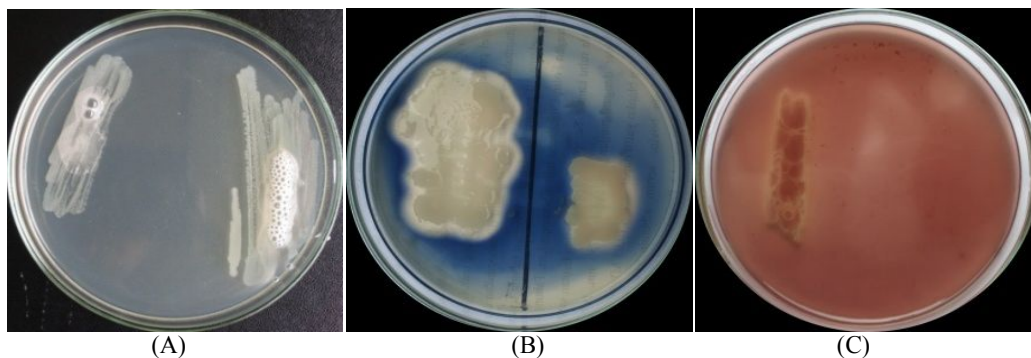


**Gambar 1.** A. isolat bakteri yang tumbuh disekitar potongan umbi dahlia B.isolat bakteri LBKURCC58; C. Gram positif isolat bakteri bentuk basil (a)

**Tabel 2.** Karakteristik biokimia bakteri endofitik

No	Kode isolat	Karakteristik biokimia		
		Katalase	Pati	Inulinase
1	LBKURCC58	+	+	+
2	LBKURCC59	+	+	+
3	LBKURCC60	+	+	+
4	LBKURCC61	+	+	+
5	LBKURCC62	+	+	-
6	LBKURCC63	-	-	-
7	LBKURCC64	+	+	+

Keterangan: (+) isolat bakteri positif terhadap uji (-) isolate bakteri negatif terhadap uji



**Gambar 2.** Karakteristik biokimia bakteri endofitik, A. uji katalase; B. uji hidrolisis pati; C. uji inulinase, a: gelembung-gelembung gas O<sub>2</sub>; b. zona bening

### 3.2. Identifikasi Bakteri Endofitik

Karakterisasi mikroskopis, makroskopis dan uji biokimia seperti uji katalase, uji hidrolisa pati dan kasein, pencairan gelatin, reduksi nitrat, reduksi nitrit, uji Voges-Prauer, uji indol, urease, penggunaan sitrat, produksi asam dari glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, rafinosa, sorbitol, salisin, arabinosa, silosa dan manitol. Karakterisasi ini menunjukkan hasil identifikasi bahwa dari tujuh isolat bakteri endofitik yang berhasil diisolasi maka diperoleh tujuh spesies bakteri yang berbeda dari lima genus yang berbeda.

**Tabel 3.** Identifikasi spesies bakteri endofitik

No	Kode isolat	Spesies bakteri
1	LBKURCC58	<i>Bacillus coagulans</i> LBKURCC58
2	LBKURCC59	<i>Pseudomonas stutzeri</i> LBKURCC59
3	LBKURCC60	<i>Acinetobacter antratus</i> LBKURCC60
4	LBKURCC61	<i>Bacillus panthothenicus</i> LBKURCC61
5	LBKURCC62	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> LBKURCC62
6	LBKURCC63	<i>Alcaligenes faecalis</i> LBKURCC63
7	LBKURCC64	<i>Alcaligenes odorans</i> LBKURCC64

#### 4. Kesimpulan

Isolasi bakteri endofitik dari jaringan umbi dahlia yang berasal dari Padang Panjang dan Kota Saribudolok diperoleh sebanyak tujuh isolat. Lima diantaranya merupakan gram negatif dan selebihnya merupakan gram positif. Keseluruhan isolat bakteri endofitik memiliki bentuk sel batang (basil). Identifikasi spesies bakteri menunjukkan bahwa isolat bakteri yang berhasil diisolasi merupakan bakteri *Bacillus coagulans* LBKURCC58, *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC59, *Acinetobacter antratus* LBKURCC60, *Bacillus pantothenicus* LBKURCC61, *Actinobacillus actinomycetem-comitans* LBKURCC62, *Alcaligenes faecalis* LBKURCC63, *Alcaligenes odorans* LBKURCC64.

#### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga penelitian Universitas Riau yang telah mendanai penelitian ini.

#### Daftar Pustaka

- Cappuccino, J.G and Sherman, N.2011. Microbiology a Laboratory Manual.Benjamin Cummings, San Fransisco.
- Goryluk, A., Burlaga, H.R., and Blaszczyk, M.2009. Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes of Chelidonium Majus L. Polish Journal of Microbiology 58:355-361.
- Hallmann, J and Berg, G. 2006.Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. Microbial Root Endophyte. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Jerman.

- Holt,J.G., Krieg,N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 2000.Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ninth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Pimentel, M.R., Molina, G., Dionisio, A.P., Junior, M.R.M., and Pastore, G.M.2011. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process.Biotechnology Research International 2011.
- Radji, M.2005.Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal.Majalah Ilmu Kefarmasian 2(3): 113 – 126.
- Randiska,V.2010.Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Umbi, Daun, dan Bunga Dahlia (*Dahlia variabilis*) Warna Merah dan Putih.Skripsi FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Schlegel, H.G and Schmidt, K.1994.Mikrobiologi Umum.Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Strobel, G and Daisy, B.2003.Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.Microbiology and Molecular Biology Reviews 67:491-502.
- Suryadi, A.E.2007.Ekstraksi dan Uji Aktivitas Antimikroba ekstrak Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*).Skripsi FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.