

Skrining Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*)

Robi'a¹, Fifi Puspita², dan Saryono³

¹Mahasiswi Program Studi S1 Kimia FMIPA Universitas Riau

²Jurusan Agroteknologi FAPERTA Universitas Riau

³Bidang Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau

Kampus Binawidya Panam, Pekanbaru 28293

E-mail: bie2_chem@ymail.com

Abstract

Endophytic bacteria are bacteria that live in plant tissues and it is not become parasite to the host. Endophytic bacteria produce some bioactive compound that identical to the host even more high amount. Root of dahlia (*Dahlia variabilis*) has many beneficial effects to human health, such as antibacterial and antifungi. There is no study about endophytic bacteria from the roots of dahlia (*Dahlia variabilis*) to produce metabolite secondary, therefor need to do a screening of endophytic bacteria from root of dahlia. This study was done continuously. First step is isolation of endophytic bacteria from steril dahlia by directing plate to NA. second step is identification of endophytic bacteria by microscopic and macroscopic and also biochemical test. The result of isolation is 12 isolate of endophytic bacteria. Gram stain show that endophytic bacteria is gram negative. The biochemical test showed that 8 isolate endophytic bacteria is *Pseudomonas stutzeri* bacteria, 2 isolate is *Pseudomonas cepacia* bacteria and 2 isolate is *Pseudomonas stutzeri/Pseudomonas cepacia*.

Keywords: *bioactive compound, Dahlia variabilis, endophytic bacteria*

1. Pendahuluan

Bakteri endofitik merupakan sumber keanekaragaman genetik yang kaya dan dapat diandalkan. Bakteri endofitik pertama kali dilaporkan oleh Darnel *et al.* pada tahun 1904 sejak itu definisi bakteri endofitik telah disepakati sebagai bakteri yang hidup di dalam jaringan internal tumbuhan hidup tanpa menyebabkan efek negatif. Sifat bakteri endofitik yang tidak berdampak negatif pada jaringan tumbuhan menunjukkan kemungkinan adanya hubungan simbiosis mutualisme antara mikroba endofitik dan inangnya (Prasetyoputri dan Ines, 2006).

Tanaman inang merupakan sumber makanan bagi bakteri endofitik dalam melengkapi siklus hidupnya (Melliawati, 2006). Bakteri ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan, dalam hal ini bakteri endofitik mendapat nutrisi dari hasil metabolisme tanaman sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif (Metabolit sekunder) yang diperlukan selama hidupnya (Simarmata *et al.*, 2007). Metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri endofitik dipercaya memberi keuntungan pada tanaman inangnya karena dapat berfungsi sebagai pengatur pertumbuhan, antimikroba dan antiserangga (Prasetyoputri dan Ines, 2006). Bakteri endofitik meningkatkan pertumbuhan tanaman dan mengurangi gejala penyakit

yang disebabkan oleh tumbuhan patogen dengan melawan langsung atau dengan menyingkirkan bakteri patogen. Hubungan antara bakteri endofitik dan tanaman telah ditemukan pada berbagai organ tumbuhan seperti umbi, batang, daun, buah, bunga dan biji. Bagian umbi dari tanaman disinyalir memiliki bakteri endofitik yang lebih banyak (Simarmata *et al.*, 2007).

Dahlia (*Dahlia variabilis*) merupakan tanaman perdu berumbi asal Meksiko yang sangat mudah ditanam dan berkembang biak. Bunga dahlia dinamakan untuk menghormati ahli Botani berkebangsaan Swedia dari abad ke-18 yang bernama Anders Dahl. Ahli tanaman yang berhasil mengembangbiakkan dahlia yang kemudian dinamakan *Dahlia juarezii* (Grieve, 2006). Tanaman ini memiliki tinggi sekitar 60-150 cm, batangnya tegak, bercabang dan tidak berbulu. Letak daun-daunnya tersusun bersebelahan, memiliki satu sampai tiga buah sirip dengan pinggir yang bergerigi. Diatas tangkai yang kecil, halus dan panjang, terdapat bunga yang indah dengan warna-warna tertentu (Adam, 1999).

Umbi dahlia mengandung hampir 70% pati dalam bentuk inulin yang dapat diekstraksi dan dimanfaatkan dibidang kedokteran. Inulin dapat difermentasi oleh enzim tertentu atau oleh jamur tanah, sehingga inulin akan

berubah menjadi fruktosa, suatu gula yang banyak digunakan dalam pengawetan makanan atau pembuatan sirup (Amire, 2008). Selain menghasilkan metabolit primer tumbuhan dahlia (*Dahlia variabilis*), juga menghasilkan metabolit sekunder.

Hasil positif pada uji fitokimia dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) terhadap senyawa golongan fenolik dan flavonoid menunjukkan bahwa umbi dahlia (*Dahlia variabilis*) mengandung metabolit sekunder. Senyawa golongan fenolik merupakan metabolit sekunder yang mempunyai sifat antimikroba, oleh karena itu ekstrak n-heksana, ekstrak metanol dan fraksi-fraksi umbi dahlia (*Dahlia variabilis*) memiliki keaktifan untuk menghambat pertumbuhan mikroba yaitu *Escherichia coli*, *Basillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida utilis* dan *Penicillium sp.*

Keaktifan yang cukup tinggi terhadap mikroba uji ditunjukkan pada *Candida utilis* maka sangat memungkinkan senyawa ini bisa digunakan sebagai obat Candidialis (Suryadi, 2007). Octaria (2010) telah melakukan penelitian uji antijamur ekstrak n-heksana dan ekstrak metanol dari umbi dahlia (*Dahlia variabilis*) berbunga merah terhadap jamur *Candida albicans* (penyebab keputihan) dan *Microsporum gypseum* (penyebab panu), hasilnya memeperlihatkan bahwa ekstrak metanol dari umbi dahlia (*Dahlia variabilis*) berbunga merah memiliki aktivitas yang dapat menghambat pertumbuhan kedua jamur patogen kulit tersebut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk skrining bakteri endofitik dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah autoclaf (1925/KY-23D), mikroskop, inkubator (Model 100-800), cawan petri, jarum ose, kaca objek, kaca penutup, pisau dan peralatan gelas yang biasa digunakan di Laboratorium kimia sesuai dengan prosedur kerja.

2.2. Alat

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah umbi dahlia, larutan etanol 70%, larutan asam peroksida 15% dan 3%, aquades steril, aquades, kertas saring, Nutrien Agar (Merck, Cat.No. 1.05450.0500), Nutrien Broth (Merck, Cat.No. 1.05443.0500), Nutrien Gelatin, *Starch agar*, ketokonazol, kristal violet, lugol, iodine, etanol 96%, safranin, dan NaCl.

2.3. Penentuan Lokasi

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode survey, penentuan lokasi pengambilan sampel dilakukan secara *Purposive Sampling*. Penelitian ini tidak dilakukan pada seluruh populasi, tetapi terfokus pada keberadaan tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*).

2.4. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) yang diambil dari Padang Luar provinsi Sumatra Barat. Umbi diambil dalam kondisi segar dimasukkan ke dalam kantong plastik yang berisi sedikit tanah.

2.5. Isolasi Bakteri Endofitik dari Umbi

2.5.1. Sterilisasi Permukaan Umbi

Sebelum dilakukan skrining bakteri endofitik dari umbi tanaman dahlia, umbi tersebut dicuci hingga steril. Umbi dahlia dicuci dengan air mengalir sampai umbi bersih, umbi disterilisasi dengan cara direndam dalam larutan etanol 70% selama 3 menit, lalu direndam dalam larutan asam peroksida 15% selama 5 menit dan direndam lagi dalam larutan etanol 70% selama 30 detik kemudian dibilas dengan aquades steril.

2.5.2. Uji Sterilitas

Untuk mengetahui bahwa permukaan umbi telah steril, aquades sisa bilasan terakhir diinokulasi pada permukaan NA dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Umbi dinyatakan telah steril jika tidak ditemukan pertumbuhan apapun pada media tersebut.

2.5.3. Inkubasi Umbi Steril

Umbi yang telah steril dikeringkan dengan kertas saring steril, lalu dipotong menjadi 3 bagian dan 1 bagian dipotong 3 bagian lagi dengan ukuran lebih kurang 1 cm² dan diletakkan di atas media NA yang telah ditambahkan ketokonazol 0,3g/100mL. Cawan petri yang sudah mengandung potongan umbi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Bakteri yang telah tumbuh di sekitar jaringan umbi dilakukan pengenceran serial sehingga didapat koloni tunggal pada media. Koloni yang telah tumbuh diremajakan ke media NB dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang telah diinkubasi disubkultur ke NA (petri dan agar miring).

2.5.4. Pewarnaan Gram

Preparat ulas dibuat dengan mengambil 1 ulasan biakan bakteri dari Nutrien agar miring dengan menggunakan jarum ose, selanjutnya diratakan diatas kaca preparat yang sudah ditetesi dengan aquades. Ulasan difiksasi dengan melewati diatas api lampu spiritus hingga menjadi kering. Kemudian ulasan diberi beberapa tetes kristal violet dan dibiarkan sekitar 1 menit, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Selanjutnya ulasan ditetesi dengan larutan lugol iodine dan dibiarkan sekitar 1 menit, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Ulasan diberi larutan pemucat (etanol 96%) setetes demi setetes hingga tetesan etanol yang jatuh tidak berwarna, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Safranin ditetesi diatas ulasan dan dibiarkan selama 45 detik, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Preparat dikeringkan dengan menempelkan tisu disisi ulasan, lalu dibiarkan mengering di udara. Kemudian preparat diamati dibawah mikroskop.

2.6. Uji biokimia

2.6.1. Uji katalase

Biakan murni diinokulasi ke dalam masing-masing tabung medium NA miring dan satu tabung untuk kontrol. Diinkubasi selama 48 jam. Setelah diinkubasi pada masing-masing tabung ditambahkan 2-3 tetes larutan H₂O₂ 3% pada permukaan media, jika terjadi reduksi H₂O₂ akan terlihat adanya gelembung O₂ di sekeliling pertumbuhan bakteri.

2.6.2. Uji Hidrolisis Gelatin

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam medium nutrisi gelatin pada tabung reaksi secara aseptik diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kemudian kultur diletakkan pada pendinginan dengan suhu 4°C selama 30 menit. Indikator pengamatan reaksi positif jika medium tetap menjadi cair dan negatif apabila medium berubah menjadi padat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis gelatin sehingga medium tetap cair saat didiamkan pada suhu 4°C selama 30 menit.

2.6.3. Uji Hidrolisis Pati

Starch agar dimasukkan dalam cawan petri. Isolat bakteri diinokulasi dengan cara menempatkan satu jarum ose biakan ditengah cawan petri kemudian disebarakan seluas 0,5 cm dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan iodine di atas permukaan koloni isolat bakteri yang tumbuh. Uji akan bernilai positif apabila di sekeliling koloni terbentuk zona bening dan ini menandakan terjadinya proses hidrolisis pati. Uji akan bernilai negatif jika di sekeliling koloni terbentuk warna biru kehitaman.

2.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar meliputi karakterisasi makroskopis dan mikroskopis serta uji biokimia.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Karakterisasi Morfologi Mikroskopis dan Makroskopis

Hasil pengamatan bakteri endofitik yang diisolasi dari umbi dahlia (*dahlia variabilis*) yang berwarna merah hati, orange, kuning cokelat dan ungu berasal dari daerah Padang Luar. Jumlah bakteri endofitik yang berhasil diisolasi sebanyak 12 isolat. Karakterisasi morfologi bakteri endofitik secara makroskopis untuk 12 isolat menunjukkan bentuk, tepian, permukaan, ukuran dan warna yang seragam dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri endofitik umbi dahlia. a). Umbi dahlia steril, b). Bakteri endofitik dan c). Koloni tunggal.

Data yang diperoleh bahwa karakterisasi morfologi koloni bakteri endofitik secara makroskopis menunjukkan hasil yang seragam pada 12 isolat. Pengamatan karakteristik morfologi koloni dilakukan pada plate agar, beberapa koloni mungkin akan berwarna, ada yang berbentuk lingkaran, sementara yang lain tidak teratur. Karakteristik koloni dapat ditinjau dari bentuk, ukuran, warna, permukaan, tepian. Morfologi makroskopis bakteri yang telah diperoleh dapat mengetahui kemungkinan genus dari bakteri endofitik tersebut. Genus yang mempunyai kemiripan morfologi koloni pada hasil penelitian ini antarlain: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Pseudomonas* (Lay, 1994).

3.2. Pewarnaan Gram

Isolat bakteri endofitik dari umbi dahlia dilakukan pewarnaan Gram bertujuan menentukan jenis bakteri berdasarkan Gram positif atau Gram negative. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram pada penelitian ini memberikan warna merah muda pada keseluruhan isolat dapat dilihat pada Gambar 2. Hal ini membuktikan bahwa keseluruhan isolat adalah bakteri Gram negatif. Warna merah muda tersebut berasal dari pewarna safranin yang melekat pada sel. Hal ini dikarenakan mekanisme penyerapan warna pada bakteri Gram positif dan Gram negatif berbeda. Warna ungu yang terjadi pada pewarnaan gram menunjukkan bakteri yang diidentifikasi adalah bakteri gram positif, ini disebabkan oleh kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat aseton alkohol. Sedangkan bakteri gram negatif ditunjukkan dengan warna merah yang terjadi pada pewarnaan gram, disebabkan kompleks tersebut larut pada saat pemberian aseton alkohol dan mengambil warna merah safranin (Lay, 1994). Menurut MacFaddin 1980, bakteri yang termasuk bakteri Gram negatif antara lain: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Fusobacterium*, *Brucella*.



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram bakteri berwarna merah muda (bakteri Gram negatif) a) bentuk bakteri endofitik.

Tabel 2. Karakterisasi bakteri endofitik secara pewarnaan Gram

No.	Sampel	No Kultur	Pewarnaan Gram	
			Ungu	Pink
1		LBKURCC 44		✓
2	Kuning coklat	LBKURCC 45		✓
3		LBKURCC 46		✓
4		LBKURCC 47		✓
5	Merah hati	LBKURCC 48		✓
6		LBKURCC 49		✓
7		LBKURCC 50		✓
8	Orange	LBKURCC 51		✓
9		LBKURCC 52		✓
10		LBKURCC 53		✓
11	Ungu	LBKURCC 54		✓
12		LBKURCC 55		✓

Keterangan tabel: tanda (✓) berarti bakteri menunjukkan ciri bakteri Gram negatif

3.3. Uji Biokimia

Uji secara makroskopis dan mikroskopis dapat diketahui Genus bakteri saja sedangkan spesies bakteri dapat diketahui dengan uji biokimia karena pada makhluk hidup terjadi reaksi-reaksi kimia yang disebut dengan metabolisme. Metabolisme dibedakan menjadi dua jenis yaitu katabolisme dan anabolisme. Hasil penelitian ini memperlihatkan kemampuan bakteri terhadap reagen-reagen yang terdapat pada media uji.

Uji katalase untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase atau tidak. Uji ini menunjukkan semua isolat positif menghasilkan enzim katalase. Uji hidrolisis pati untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghidrolisis pati dengan cara menghasilkan enzim amilase. Uji ini menunjukkan semua isolat positif menghasilkan enzim amilase. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil penelitian pada Gambar 3 terlihat bahwa keseluruhan isolat mampu menghasilkan gelembung gas pada permukaan koloni yang ditetesi senyawa H_2O_2 . Hal ini menduga bahwa bakteri endofitik menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase memiliki kemampuan menguraikan H_2O_2 yang dihasilkan oleh bakteri. Bakteri yang memerlukan O_2 akan menghasilkan H_2O_2 yang sebenarnya beracun bagi bakteri tersebut. Bakteri dapat tetap bertahan dengan menghasilkan enzim katalase yang

berfungsi mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Bakteri yang positif menghasilkan enzim katalase yaitu: *Moraxella liquefaciens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Branhamella catarrhalis*, *Pseudomonas spp.*, *Yersinia pseudotuberculosis* (MacFaddin 1980).

Enzim amilase positif dihasilkan oleh seluruh isolat bakteri endofitik pada uji hidrolisis pati. Pati merupakan polisakarida yang memiliki berat molekul yang tinggi, sehingga tidak mampu diserap oleh membran sel. Uji positif ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar daerah pertumbuhan bakteri dan tidak terjadi perubahan warna media setelah penambahan larutan iod. Hal ini menunjukkan pati telah terhidrolisis menjadi sakarida yang lebih sederhana dapat dilihat pada Gambar 3. Bakteri yang positif menghasilkan enzim amilase yaitu: *Pseudomonas stutzeri* (MacFaddin 1980).

Hasil uji biokimia (spora, aerob, katalase, motilitas, fluoresen dalam sinar UV, tumbuh di MCA, penggunaan sitrat, pati, glukosa, laktosa, maltose, manitol, salisin, sukrosa, xilosa, urease, gelatin, kasein, tumbuh di suhu 42 °C, reduksi nitrit menjadi gas N_2 dan reduksi nitrat menjadi nitrit) menunjukkan bahwa 8 isolat bakteri endofitik yang diperoleh adalah bakteri *Pseudomonas stutzeri*, 2 isolat bakteri *Pseudomonas cepacia* 2 isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri/Pseudomonas cepacia* dapat dilihat pada Tabel 4.



Gambar 3. a). Hasil uji katalase positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara dan b). Hasil uji patipositif ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media

Tabel 4. Hasil identifikasi tingkat kesamaan pada bakteri endofitik dari umbi dahlia

No	No Kultur	Tingkat kesamaan tertinggi (%)	
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
1	LBKURCC 44	78.26	82.61
2	LBKURCC 45	82.61	86.96
3	LBKURCC 46	78.26	78.26
4	<i>LBKURCC 47</i>	82.61	78.26
5	<i>LBKURCC 48</i>	78.26	73.91
6	LBKURCC 49	69.57	73.91
7	LBKURCC 50	82.61	82.61
8	LBKURCC 51	69.57	86.96
9	LBKURCC 52	69.57	86.96
10	LBKURCC 53	73.91	78.26
11	LBKURCC 54	73.91	82.61
12	LBKURCC 55	69.57	73.91

Keterangan: Tanda merah pada tulisan menunjukkan spesies dari isolat tersebut.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, karakterisasi bakteri endofitik secara makroskopis dan mikroskopis diperoleh genus antara lain: *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*, *Pseudomonas*. Identifikasi bakteri endofitik berdasarkan pewarnaan Gram merupakan bakteri Gram negatif yaitu genus *Pseudomonas*. *Moraxella*,

Fusobacterium, *Brucella* dan identifikasi bakteri endofitik berdasarkan uji biokimia diperoleh 8 isolat bakteri endofitik adalah bakteri *Pseudomonas stutzeri*, 2 isolat bakteri *Pseudomonas cepacia* dan 2 isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri/Pseudomonas cepacia*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga

Penelitian Universitas Riau yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Adam, T. 1999. Tumbuhan Hias. Penerbit Gama Utama, Medan.
- Amire. 2008. Budidaya Bunga Dahlia (*Dahlia spp. L.*). [http:// bioma.com](http://bioma.com). Tanggal akses 9/01/2011.
- Grieve, M. 1995. A Modern Herbal. Dahlias. <http://botanical.com.dahlia>. Tanggal akses 9/01/2011.
- Lay, B. W. 1994. Analisa Mikroba di Laboratoium. Edisi 1. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta. 99-100.
- Melliawati, R., Widyaningrum, D. N., Djohan, A. C., dan Sukiman, H. 2006. Pengkajian Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Bioaktif Untuk Prteksi Tanaman. *Jurnal Biodivertas* 7(3): 221-224.
- MacFaddin, J.F. 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. Edisi ke-(II). Baltimore, London.
- Octarina, N. 2010. Uji Aktivitas Antijamur dan Penentuan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum Ekstrak dan Fraksinat dari Umbi Dahlia (*dahlia variabilis*). Skripsi FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Prasetyoputri dan Ines, A., dan Atmosukarto. I. 2006. Mikroba endofitik. *Majalah Populer Bioteknologi* 1(2): 13-15.
- Sirmarmata, R., Lekatompessy, S., dan Sukiman, H. 2007. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba. *Jurnal Berk Penel Hayati* 13: 85-90.
- Suryadi, A. E. 2007. Ekstraksi dan Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*). Skripsi FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.