



Keanekaragaman dan Sebaran Mikroba Endofit *Indigenous* Pada Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)

Author(s): Fitra Parlindo⁽¹⁾; Erfan Dani Septia⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universitas Muhammadiyah Malang

* Corresponding author: erfandani@umm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman mikroba endofit indigenous pada berbagai bagian jaringan tanaman kedelai dan menguji virulensinya secara in vitro. Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi. Hasil eksplorasi cendawan endofit indigenous berjumlah 11 isolat dan bakteri berjumlah 3 isolat. Cendawan endofit indigenous berhasil diisolasi dari seluruh jaringan tanaman, kecuali polong. Keragaman cendawan endofit indigenous tertinggi terdapat pada jaringan akar dan batang, yaitu masing-masing berjumlah 4 isolat. Identitas cendawan endofit indigenous yang berhasil diidentifikasi antara lain adalah *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., dan *Penicillium* sp. Adapun 6 isolat lainnya tidak dapat teridentifikasi. Bakteri endofit indigenous hanya terisolasi dari jaringan polong, akar, dan tanah. Seluruh bakteri merupakan golongan bakteri Gram negatif. Berdasarkan hasil Uji Hipovirulensi, terhadap 7 isolat cendawan endofit indigenous yang masuk dalam kategori hipovirulen dan 4 isolat lainnya bersifat virulen. Sedangkan semua isolat bakteri endofit indigenous yang diuji menunjukkan kategori virulen.

Kata Kunci:

Endofit;
Kedelai;
Mikroba;

ABSTRACT

Keywords:

Soybeans;

Microbes;

Endophytic;

*The high demand for soybean commodities is in line with the increasing public This study aims to determine the diversity of indigenous endophytic microbes in various parts of soybean tissue and examine the virulence in vitro method. This study used an exploration method. The results of the exploration of indigenous endophytic fungi amounted to 11 isolates and bacteria totaling 3 isolates. Indigenous endophytic fungi were isolated from all plant tissues, except pods. The highest diversity of indigenous endophytic fungi was found in root and stem tissues, which are 4 isolates respectively. The identities of indigenous endophytic fungi that were successfully identified were *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., and *Penicillium* sp. The other 6 isolates cannot be identified. Indigenous endophytic bacteria were only isolated from pods, roots and soil tissue. All bacteria were Gram negative bacteria. Based on the results of the hypovirulence test, 7 isolates of indigenous endophytic fungi were included in the hypovirulent category and 4 other isolates were virulent. While all indigenous endophytic bacterial isolates showed a virulent category.*

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) adalah salah satu tanaman pangan yang sangat populer di dunia, termasuk di Indonesia. Permintaan yang tinggi terhadap komoditas ini seiring dengan peningkatan konsumsi masyarakat pada produk-produk olahannya. Kenyataan tersebut tidak diimbangi dengan peningkatan produktivitas kedelai dalam negeri. Riniarsi (2016) melaporkan bahwa produktivitas kedelai tahun 2016 bahkan mengalami penurunan sebesar 3.95% dibandingkan tahun sebelumnya.

Satu dari beberapa faktor yang menyebabkan penurunan produksi kedelai yaitu karena penyakit yang disebabkan oleh virus tanaman. Pencegahan dan penanganan yang terlambat mengakibatkan kerugian tidak dapat dihindari. Seiring dengan tren pengurangan bahan kimia sintetis pada praktik budidaya tanaman, aplikasi mikroba endofit *indigenous* menjadi solusi alternatif dalam pengendalian penyakit yang disebabkan oleh virus tanaman. Berg (2009) menyatakan bahwa mikroba endofit biasanya hidup di dalam jaringan tanaman yang sama dengan bakteri atau jamur penyebab penyakit sehingga sangat cocok dijadikan sebagai agen pengendali hayati. Yulianti (2012) melaporkan bahwa mikroba endofit secara alami merupakan bagian dari tanaman sehat. Oleh karena itu, endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif. Mikroba endofit *indigenous* artinya adalah mikroba endofit yang berasal dari dalam jaringan tanaman itu sendiri, umumnya terdiri atas golongan cendawan dan bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman mikroba endofit *indigenous* pada berbagai bagian jaringan tanaman kedelai dan menguji virulensinya secara *in vitro*.

METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan selama empat bulan, dari Januari hingga April 2018 di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Biomed Fakultas Kedokteran UMM. Bahan yang digunakan yakni media PDA dan NA, alkohol 70%, MgCl₂, methanol, dan akuades steril. Tanaman yang dieksplorasi adalah 5 sampel tanaman kedelai sehat berumur 65 hari yang diambil acak di kebun percobaan Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Malang.

Kegiatan isolasi cendawan dimulai dengan sterilisasi bagian tanaman (akar, batang, daun, polong, serta tanah sekitar perakaran). Bagian tanaman yang telah diambil dibersihkan dengan mencucinya pada air mengalir. Bagian tanaman dipotong 1 cm lalu direndam alkohol 70% selama satu menit. Potongan bagian tanaman direndam lagi dengan larutan MgCl₂ selama satu menit, kemudian mencucinya dengan akuades steril selama satu menit, lalu mengeringkannya dengan tisu steril. Tiap-tiap pencucian dilakukan dengan dua kali ulangan. Bagian jaringan tanaman tersebut selanjutnya ditanam pada media PDA yang telah disiapkan. Proses inkubasi dilakukan selama tujuh hari hingga munculnya koloni. Purifikasi dilakukan demi mendapatkan biakan murni dengan cara memindahkan miselium yang tumbuh ke cawan petri yang telah berisi media PDA. Sanjaya et al. (2010) menyatakan bahwa setelah diperoleh kultur murni, masing-masing isolat ditanam pada cawan yang telah berisi medium agar. Sebanyak satu ose dari masing-masing isolat diletakkan dalam tiga titik pada permukaan medium agar. Selanjutnya, cawan diberi label dan diinkubasi selama 5-7 hari. Adapun identifikasi cendawan dilakukan berdasarkan penampakan mikroskopis. Identifikasi mikroskopis cendawan disesuaikan dengan buku identifikasi (Barnett & Hunter, 1998).

Isolasi bakteri dimulai dengan sterilisasi bagian jaringan tanaman. Setiap bagian tanaman dicuci dengan air mengalir, lalu direndam alkohol 70% dan larutan $MgCl_2$, masing-masing selama satu menit. Selanjutnya mencucinya dengan akuades steril selama satu menit dan mengeringkannya dengan tisu steril. Perendaman atau pencucian dilakukan dengan dua kali ulangan. Tiap bagian tanaman kedelai dihaluskan dengan larutan methanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan natan dan supernatan. Selanjutnya, supernatan sebanyak 10 μ l dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media NA. Purifikasi bakteri dilakukan dengan memindahkan koloni bakteri yang telah tumbuh ke dalam cawan petri berisi media NA dengan metode zig-zag. Adapun identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan penampakan makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis bakteri disesuaikan dengan metode pewarnaan Gram, sedangkan identifikasi mikroskopis berdasarkan morfologi bakteri.

Tahap selanjutnya adalah uji hipovirulensi yang dilakukan pada benih tanaman mentimun, karena tanaman ini dapat memberikan respon yang cepat terhadap serangan patogen. Metode yang digunakan yaitu menurut Worosuryani et al. (2006) dengan modifikasi. Permukaan benih mentimun disterilkan alkohol 70% selama satu menit, clorox 2% selama 30 detik, lalu dibilas akuades sebanyak tiga kali, lalu dikering-anginkan. Isolat murni cendawan ditanam pada media PDA dalam botol kultur dan diinkubasi selama tiga hari. Selanjutnya, tiga benih mentimun ditanam pada tiap biakan cendawan tersebut dan diinkubasi 14 hari. Sedangkan untuk bakteri, tiga benih mentimun direndam dalam suspensi tiap bakteri selama 2 jam dan ditanam pada media NA dalam botol kultur, lalu diinkubasi 14 hari. Kontrol dibuat dengan menanam benih

pada media tanpa penambahan cendawan dan bakteri endofit. Pertumbuhan benih mentimun diamati setiap hari. Indeks keparahan penyakit pada hasil perkecambahan mentimun dideterminasikan dengan skor individual hasil modifikasi Worosuryani et al. (2006) sebagai berikut:

$$DSI = \frac{\sum N}{Z}$$

Keterangan :

DSI = *Disease Severity Index* (Indeks Keparahan Penyakit)

N = Nilai tingkat keparahan penyakit masing-masing individu

Z = Jumlah individu yang digunakan

Nilai Tingkat keparahan penyakit:

- 0 = Sehat dan tidak ada infeksi pada hipokotil,
- 1 = Satu atau dua bercak coklat muda <0,25 cm,
- 2 = Bercak coklat muda <0,5 cm dan area kebasahan <10% pada hipokotil,
- 3 = Bercak coklat muda sampai tua >1,0 cm dan kemudian bergabung dengan bercak lainnya dan daerah kebasahan $10\% < x < 100\%$ pada hipokotil (daun belum layu dan hipokotil masih tegar dan putih,
- 4 = Hipokotil bercak hitam, daun layu, dan bibit mati.

Worosuryani et al. (2006) melaporkan isolat yang tidak menyebabkan gejala penyakit atau menunjukkan sedikit gejala ($DSI < 2,0$) pada perkecambahan mentimun dikategorikan sebagai isolat hipovirulen. Sneh et al. (2004) juga mengklasifikasikan virulensi isolat cendawan atas lima kategori berdasarkan nilai DSI dan gejalanya. Isolat dengan nilai DSI 0-0.3 dikategorikan sebagai isolat tidak virulen atau bersifat hipovirulen. Nilai DSI 0.4-0.9 dengan kategori virulensi rendah, 1-1.9 dengan kategori moderat, 2-2.9 dengan kategori virulen, dan 3-4 dengan kategori sangat virulen.

HASIL DAN PEMBAHASAN Eksplorasi dan Karakterisasi Mikroba Endofit *Indigenus*

Mikroba endofit *indigenus* yang berhasil dieksplorasi dari tanaman kedelai sehat varietas Gepak Kuning asal kebun percobaan Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Malang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Eksplorasi Mikroba Endofit *Indigenus* dari tanaman kedelai

Jaringan Asal Mikroba Endofit	Jenis Mikroba Endofit	
	Cendawan (isolat)	Bakteri (isolat)
Akar	4	1
Batang	4	-
Daun	2	-
Polong	-	1
Tanah	1	1
Jumlah	11	3

A. Karakterisasi dan Identifikasi Cendawan Endofit *Indigenus*

Cendawan endofit *indigenus* yang berhasil dieksplorasi berjumlah 11 isolat yang berasal dari bagian akar, batang, daun, dan tanah. Isolat cendawan tersebut diberi kode yang diawali dengan huruf CK (cendawan kedelai) lalu diikuti oleh kode asal jaringan dan nomor. Karakter makroskopis diamati 7 hari setelah inkubasi (HSI). Karakter yang diamati yakni pola sebaran miselium, warna koloni di atas dan bawah permukaan media, kecepatan pertumbuhan miselium memenuhi permukaan media agar (HSI), dan tekstur koloni. Karakter makroskopis isolat cendawan endofit disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik morfologi cendawan endofit *indigenus* secara makroskopis

Asal Jaringan	Kode Isolat	Pola Sebaran Miselium	Warna Koloni (Atas – Bawah)	Kecepatan Pertumbuhan Miselium	Tekstur Koloni
Akar	CKA1	Konsentris	Putih Merah – Putih	6 HSI	Seperti kapas dan granular
	CKA2	Konsentris	Putih – Coklat Muda	11 HSI	Kasar dan tipis
	CKA3	Konsentris	Putih Kuning – Coklat muda	6 HSI	Halus seperti kapas
	CKA4	Konsentris	Abu abu Kehitaman – Hitam	5 HSI	Halus seperti kapas
Batang	CKB1	Radial	Putih Kecoklatan – Coklat tua	6 HSI	Granular dan kompak
	CKB2	Konsentris	Putih – Coklat	10 HSI	Seperti kapas dan granular
	CKB3	Konsentris	Putih Kecoklatan – Hitam	6 HSI	Kasar dan tipis
	CKB4	Konsentris	Putih – Hitam	6 HSI	Kasar dan tipis
Daun	CKD1	Konsentris	Putih – Putih	3 HSI	Halus seperti kapas
	CKD2	Konsentris	Putih – Abu-abu	3 HSI	Seperti kapas dan tebal
Tanah	CKT	Konsentris	Hijau Putih – Hijau	12 HSI	Seperti kapas dan granular

Berdasarkan pola sebaran miselium, diperoleh dua jenis morfospesies yang berbeda yaitu koloni cendawan yang tumbuh konsentris dan radial. Isolat

cendawan yang tumbuh radial (menyebarkan dari pusat koloni ke arah tepi koloni) berasal dari jaringan batang, sedangkan 10 isolat lainnya memiliki miselium yang

tumbuh dengan pola konsentris. Warna koloni cendawan endofit yang ditemukan bervariasi, tapi cenderung didominasi oleh warna putih.

Karakterisasi morfologi cendawan endofit secara mikroskopis dilakukan menggunakan fotomikroskop optik dengan perbesaran 40x. Karakter yang diamati yakni bentuk hifa dan konidia. Identitas cendawan endofit indigenous diamati dengan bantuan buku Identifikasi *Illustrated Genera of Imperfect fungi* Barnett and Hunter (1998) berdasarkan hasil karakteristik mikroskopis.

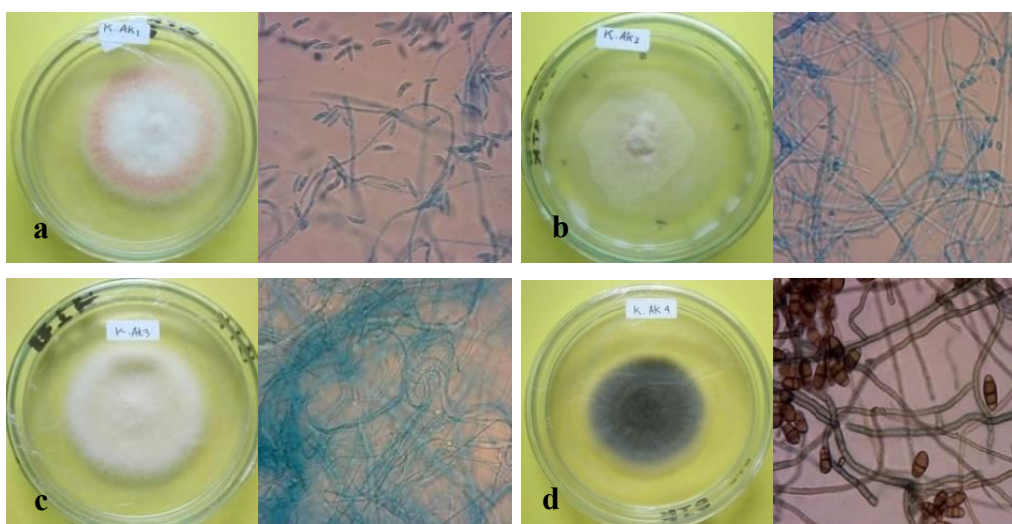
Hasil identifikasi menunjukkan bahwa terdapat 5 isolat cendawan yang berhasil diketahui identitasnya. Berdasarkan identitas tersebut, isolat cendawan indigenous bersifat parasit maupun saprofit pada tanaman. Cendawan parasit yaitu cendawan yang cara hidupnya adalah dengan memperoleh bahan organik dari inangnya (tumpangan), sedangkan cendawan saprofit menurut Sudantha (2009) adalah mikrobia yang mengambil makanan dari sisa bahan organik atau

bahan mati. Adapun 6 isolat lainnya tidak dapat teridentifikasi karena tidak ditemukannya bagian-bagian lain seperti spora atau konidia yang dapat menunjukkan identitas cendawan untuk dikelompokkan ke marga tertentu. Hasil karakterisasi dan identifikasi masing-masing isolat dideskripsikan pada Gambar 1.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Cendawan Endofit Indigenous

Hasil Identifikasi	Jumlah (Isolat)	Keterangan
<i>Fusarium</i> sp.	1	Isolat CKA1
<i>Verticillium</i> sp.	1	Isolat CKA2
<i>Alternaria</i> sp.	1	Isolat CKA4
<i>Aspergillus</i> sp.	1	Isolat CKB1
<i>Penicillium</i> sp.	1	Isolat CKT
Hifa Steril (Unidentified)	6	Isolat CKA3, CKB2, CKB3, CKB4, CKD1, dan CKD2

1. Cendawan Endofit *Indigenous* Asal Akar



Gambar 1. Penampakan Koloni Isolat Cendawan Endofit Asal Akar: (a) Isolat CKA1, (b) Isolat CKA2, (c) Isolat CKA3, dan (d) Isolat CKA4

Isolat CKA1 mempunyai koloni dengan tekstur seperti kapas berwarna

putih keunguan (Gambar 1a). Pola sebaran miseliumnya konsentris dengan

pertumbuhan yang cepat pada 6 HSI. Struktur hifanya berseptata dan hialin dengan konidia berupa makrokonidia. Isolat yang menunjukkan ciri morfologi seperti ini diidentifikasi sebagai *Fusarium* sp. Cendawan *Fusarium* sp. juga telah berhasil diisolasi pada akar beberapa jenis kacang-kacangan. El-Maghraby et al. (2013) menemukan bahwa *Fusarium* adalah genus cendawan endofit yang paling dominan pada perakaran *Leguminacea*. Meski genus tersebut memiliki nama yang mirip dengan patogen, isolat *Fusarium* yang diperoleh tidak menghambat pertumbuhan tanaman bahkan beberapa isolat dapat meningkatkan pertumbuhan kacang tanah secara nyata. Istifadah and Sari (2017) juga melaporkan bahwa sebagian besar isolat yang diperoleh dari akar tanaman kacang adalah genus *Fusarium*.

Isolat CKA2 memiliki koloni dengan tekstur kasar dan tipis, berwarna putih, pola sebaran miselium konsentris, dan pertumbuhan miselium yang lambat pada 11 HSI. Struktur hifa yang terbentuk berseptata dan hialin, dengan konidia berupa makrokonidia. Isolat ini diidentifikasi sebagai *Verticillium* sp. Hardaningsih (2012) melaporkan *Verticillium* sp. sebagai cendawan yang bersifat parasit. Ahmad (2013) melaporkan bahwa koloni *Verticillium* sp. dapat tumbuh dengan sedang dan cepat pada suhu 25°C di media PDA. Koloni pada permukaan memiliki warna putih dan dari dasar cawan petri memperlihatkan warna putih hingga coklat (karat). Secara mikroskopis, cendawan ini mempunyai hifa yang hialin dan berseptata. Konidiofor berhialin dengan cabang atau tidak bercabang. Percabangan konidiofor terbentuk pada cincin seperti tangkai daun pada beberapa tingkatan.

Isolat CKA3 merupakan hifa steril yang memiliki koloni bertekstur halus seperti kapas dan berwarna putih kekuningan. Pola sebaran miseliumnya adalah konsentris. Terdapat kumpulan

miselium yang beerwarna putih pekat di bagian tengah. Struktur hifa isolat ini tidak berseptata dan hialin serta tidak ditemukan adanya konidia.

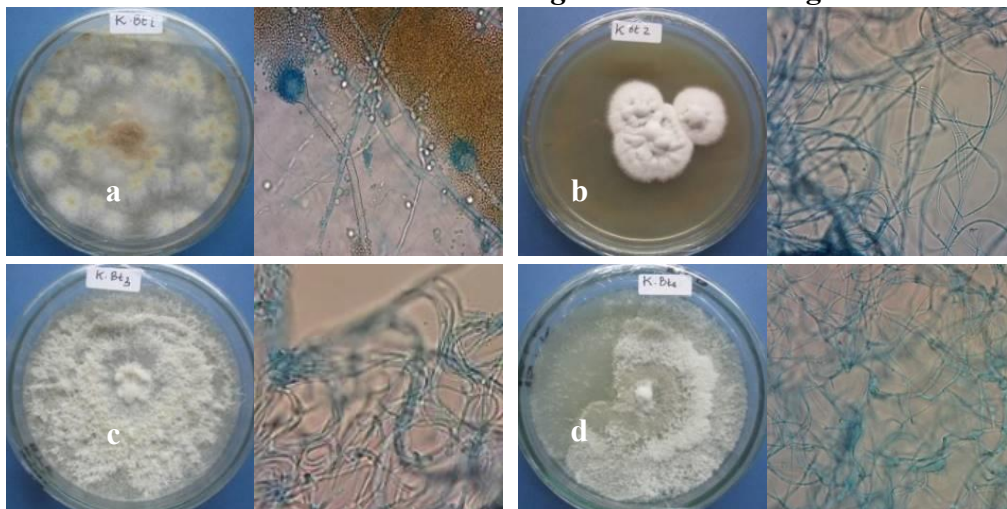
Isolat CKA4 mempunyai koloni bertekstur bulu halus serta berwarna abu-abu kehitaman pada permukaan. Pola sebaran miselium adalah konsentris dengan pertumbuhan miselium yang cepat. Struktur hifa yang terbentuk yaitu berseptata dan tampak coklat. Konidia berbentuk oval, berukuran besar, dan berwarna coklat gelap. Isolat yang menunjukkan ciri morfologi seperti ini diidentifikasi sebagai *Alternaria* sp. Hasil karakterisasi ini sesuai dengan hasil penelitian Ata et al. (2016) yang mendapati karakter morfologi *Alternaria* sp. dengan warna hifa kecoklatan, terdapat sekat pada hifa, warna konidia yang kecoklatan dengan tipe pertumbuhan konidia yang gerombol.

Isolat CKB1 memiliki koloni berwarna putih kemudian menjadi kecoklatan, di atas koloni terdapat butiran seperti serbuk yang merupakan kepala konidia. Sebaran miselium berpola radial dengan kecepatan pertumbuhan miselium tercatat cepat, dengan sebaran yang memenuhi seluruh permukaan Media PDA pada 6 HSI. Koloninya bertekstur granular dan kompak. Struktur hifa berseptata, hialin, dengan konidia berlimpah berwarna hitam. Trizelia et al. (2017) menyatakan bahwa *Aspergillus* sp. memiliki reproduksi aseksual dengan memproduksi spora yang disebut konidia. Isolat ini diidentifikasi sebagai *Aspergillus* sp. Beberapa penelitian sebelumnya juga telah berhasil mengisolasi cendawan endofit dari jaringan batang tanaman. Waruwu et al. (2016) mendapati 8 isolat cendawan endofit tidak patogen asal batang tanaman padi. Batang tanaman merupakan bagian yang paling banyak perolehan cendawan endofitnya. Trizelia et al., (2017) berhasil mengisolasi dan memurnikan *Aspergillus* sp. dari batang gandum yang sehat.

Isolat CKB2, CKB3, dan CKB4 merupakan hifa steril dengan karakteristik berbeda-beda. Koloni pada Isolat CKB2 berwarna putih dan tebal dengan pertumbuhan miselium yang relatif lambat, dan pola sebaran miselium yang konsentris. Struktur hifa yang terbentuk bersepta dan hialin serta tidak ditemukan konidia. Selanjutnya, Isolat CKB3 berwarna putih kecoklatan. Tekstur

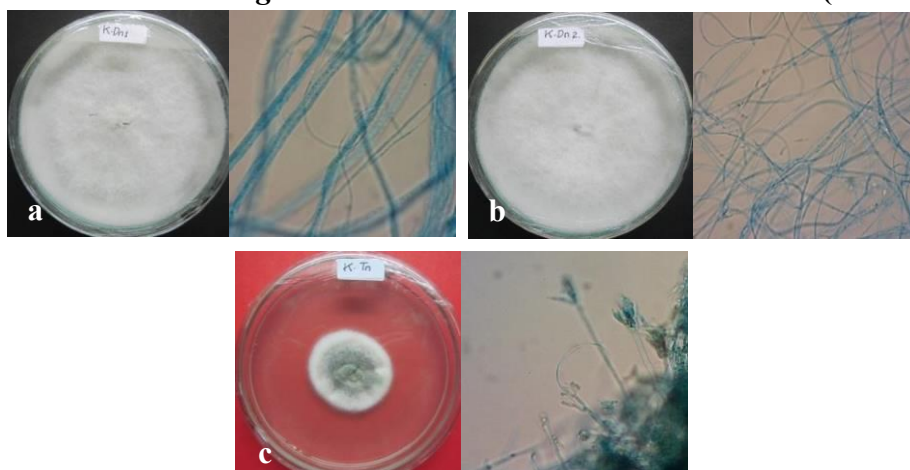
koloninya adalah kasar dan tipis. Pertumbuhan miseliumnya cepat dengan pola sebaran konsentris. Struktur hifa yang terbentuk bersepta dan hialin serta tidak ditemukan konidia. Adapun Isolat CKB4 berwarna putih dengan tekstur koloni kasar dan tipis. Pertumbuhan miseliumnya cepat dengan pola sebaran konsentris. Struktur hifa yang terbentuk adalah bersepta dan hialin serta tidak ditemukan konidia.

2. Cendawan Endofit *Indigenous* Asal Batang



Gambar 2. Penampakan Koloni Isolat Cendawan Endofit Asal Batang: (a) Isolat CKB1, (b) Isolat CKB2, (c) Isolat CKB3, dan (d) Isolat CKB4

3. Cendawan Endofit *Indigenous* Asal Daun dan Tanah Perakaran (Rhizosfer)



Gambar 3. Penampakan Koloni Isolat Cendawan Endofit Asal Daun dan Tanah Rhizosfer: (a) Isolat CKD1, (b) Isolat CKD2, dan (c) Isolat CKT

Isolat CKD1 dan CKD2 merupakan hifa steril dengan pertumbuhan yang sangat cepat hingga telah menutupi seluruh permukaan Media PDA pada 3 HSI. Koloni 2 cendawan ini berwarna putih. Adapun miselium tumbuh membentuk koloni yang luas dan halus seperti kapas dengan pola sebaran konsentris. Struktur hifa yang terbentuk tidak berseptata serta tidak ditemukan konidia. Sekilas isolat CKD2 terlihat persis dengan isolat CKD1, namun perbedaannya adalah isolat CKD2 memiliki koloni yang lebih tebal dan kompak.

Isolat CKT diidentifikasi sebagai *Penicillium* sp. Koloni cendawan ini berwarna hijau dikelilingi warna putih. Tekstur koloni seperti kapas dan granular. Hal ini sesuai dengan Augusta (2009) yang menyatakan bahwa pada medium PDA, cendawan endofit *Penicillium* sp. akan membentuk koloni berwarna hijau tua dengan warna putih di sekelilingnya. Pola

sebaran miseliumnya adalah konsentris dengan pertumbuhan miselium yang lambat. Struktur hifa yang terbentuk adalah berseptata. Purwantisari and Hastuti (2012) melaporkan bahwa *Penicillium* sp. biasanya berseptata, memiliki badan buah yang berbentuk seperti sapu diikuti sterigma, dan konidia yang tersusun seperti rantai.

B. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit *Indigenus*

Eksplorasi bakteri endofit *indigenus* pada tanaman kedelai menghasilkan 3 isolat yang berasal dari bagian polong, akar, dan tanah. Isolat bakteri tersebut diberi kode yang diawali dengan huruf BK (bakteri kedelai) dan diikuti kode asal jaringan beserta nomor. Karakterisasi bakteri endofit meliputi morfologi koloni (bentuk, elevasi, bentuk tepian, permukaan dan warna koloni), dan morfologi sel yang mencakup bentuk sel dan pewarnaan Gram (Tabel 4).

Tabel 4. Karakteristik Morfologi Koloni dan Sel Bakteri Endofit *Indigenus*

Kode Isolat	Morfologi Koloni			Morfologi Sel		
	Bentuk Koloni	Elevasi	Bentuk Tepian	Warna Koloni	Bentuk Sel	Sifat Gram
BKP	Sirkular (teratur)	<i>Flat</i> (Datar)	<i>Serrate</i> (Tepian bergerigi)	Kuning Pucat	<i>Basil</i> (Batang)	Negatif
BKA	Sirkular (teratur)	<i>Flat</i> (Datar)	<i>Entire</i> (Tepian rata)	Kuning Pucat	<i>Basil</i> (Batang)	Negatif
BKT	<i>Irregular</i> (Tidak beraturan)	<i>Flat</i> (Datar)	<i>Entire</i> (Tepian rata)	Kuning Pucat	<i>Basil</i> (Batang)	Negatif

Keterangan: BKP = Isolat bakteri asal polong, BKA = Isolat bakteri asal akar, BKT = Isolat bakteri asal tanah

Pewarnaan Gram pada isolat bakteri bertujuan melihat perbedaan morfologi dan memudahkan identifikasi bakteri menjadi dua kelompok, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Prinsip dasar dari metode pewarnaan gram adalah kemampuan dinding sel menyerap zat warna dasar setelah pencucian dengan alkohol. Sel bakteri yang bisa

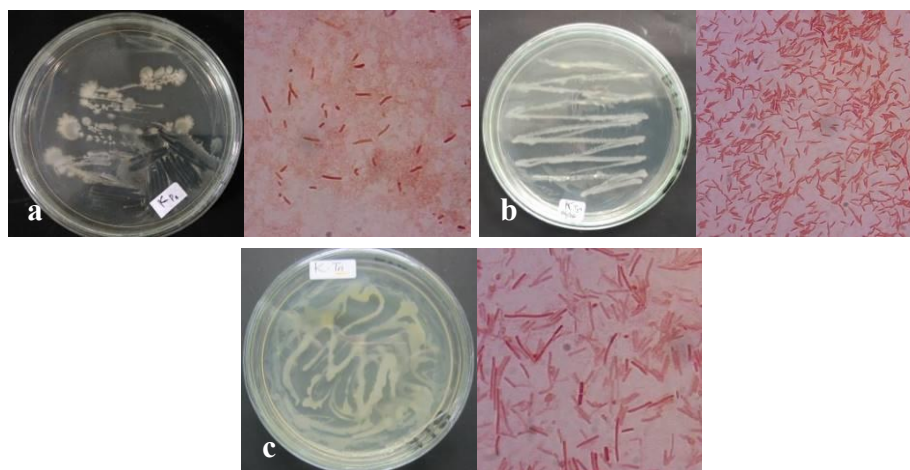
mempertahankan warna biru gelap atau ungu dari pewarna primer setelah dilakukan pencucian digolongkan ke dalam bakteri gram positif.

Sementara bakteri Gram negatif akan melepas zat warna (kristal violet) yang berwarna biru gelap atau ungu tersebut setelah dicuci dengan alkohol, lalu menyerap zat warna terakhir yang

diberikan yaitu safranin sehingga menjadi berwarna merah. Chaelani (2010) melaporkan bahwa hasil pewarnaan Gram adalah warna ungu sampai biru hitam untuk bakteri Gram positif, dan berwarna merah untuk bakteri Gram negatif.

Perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan adanya perbedaan struktur dinding sel antara dua jenis bakteri tersebut. Sastrahidayat (2011) menyatakan bahwa bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tebal dan asam

teichoic. Sementara bakteri gram negatif memiliki lapisan luar lipopolisakarida, terdiri atas membran dan lapisan peptidoglikan yang tipis terletak pada periplasma (di antara lapisan luar dan membran sitoplasmik). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 3 isolat bakteri yang diuji termasuk ke dalam golongan bakteri Gram negatif. Penampakan secara makroskopis dan mikroskopis serta deskripsi masing-masing isolat bakteri endofit disajikan pada Gambar 4 berikut ini.



Gambar 4. Penampakan Isolat Bakteri pada Media NA dan secara Mikroskopis perbesaran 100x: (a) Isolat BKP, (b) Isolat BKA, dan (c) Isolat BKT

Isolat BKP memiliki koloni berbentuk teratur dan elevasi datar dengan tepian bergerigi. Adapun Isolat BKA berbentuk teratur dan elevasi datar dengan tepian rata. Sementara Isolat BKT berbentuk tidak beraturan dan elevasi datar dengan tepian rata. Ketiga isolat ini memiliki koloni berwarna kuning pucat pada media NA. Bentuk sel bakteri ini adalah basil (batang) dengan ujung bundar. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan sel bakteri Isolat BKP dan BKT bersifat non-motil dengan penataan tunggal atau monobasil, sedangkan Isolat BKA bersifat motil dengan penataan

berpasangan atau diplobasil. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif.

Uji Hipovirulensi

Uji Hipovirulensi merupakan satu metode pengujian apakah mikroba endofit yang berasal dari berbagai jaringan tanaman bersifat virulen atau hipovirulen. Menurut Nurhayati (2010), virulensi didefinisikan sebagai derajat patogenitas suatu mikroba terhadap inangnya, sedangkan virulen adalah sifat mikroba yang sangat patogenik (menimbulkan penyakit). Safitri (2017) menambahkan

bahwa dengan kata lain, hipovirulen merupakan sifat patogen yang virulensinya rendah.

Uji hipovirulensi dilakukan pada benih mentimun. Supriyanto et al. (2009) melaporkan bahwa tanaman ini lebih responsif dan sensitif dibanding tanaman lain terhadap perubahan kondisi medium tumbuh, sehingga pemberian isolat cendawan endofit dapat langsung mempengaruhi pertumbuhannya. Berdasarkan hasil uji hipovirulensi, terdapat 7 isolat cendawan endofit yang bersifat hipovirulen dan 4 isolat cendawan endofit bersifat virulen.

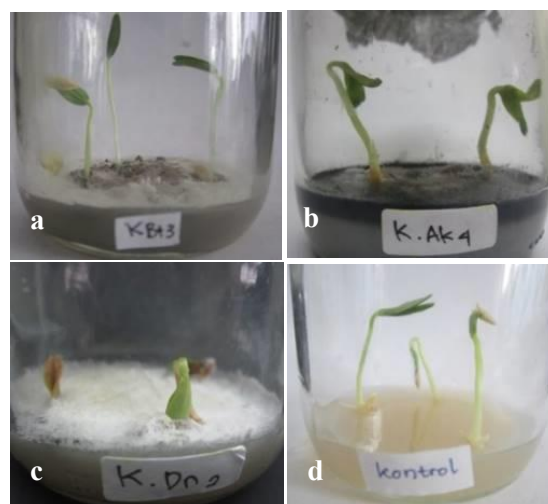
Tabel 5. Hasil Uji Hipovirulensi terhadap 11 Cendawan Endofit Indigenus

Kode Isolat	DSI*	Dugaan Hipovirulen / Virulen
CKA1	1.33	Hipovirulen
CKA2	3.67	Virulen
CKA3	3.33	Virulen
CKA4	1.33	Hipovirulen
CKB1	1.33	Hipovirulen
CKB2	1.33	Hipovirulen
CKB3	0.00	Hipovirulen
CKB4	0.00	Hipovirulen
CKD1	1.33	Hipovirulen
CKD2	3.33	Virulen
CKT	3.33	Virulen

Keterangan: *) Disease Severity Index (DSI) adalah indeks keparahan penyakit yang dinilai dengan ketentuan: 0 = sehat dan tidak ada infeksi pada hipokotil, 1 = satu atau dua bercak coklat muda <0.25 cm, 2 = bercak coklat muda <0.5 cm dan area kebasahan <10% pada hipokotil, 3 = bercak coklat muda sampai tua >1.0 cm dan kemudian bergabung dengan bercak lainnya dan daerah kebasahan 10%<x<100% pada hipokotil (daun belum layu dan hipokotil masih tegar dan putih, 4 = hipokotil bercak hitam, daun layu, dan bibit mati (Cardoso dan Echandi dalam Worosuryani, 2006).

Nilai DSI isolat cendawan yang bersifat hipovirulen adalah 0.00 dan 1.33. Nilai DSI 0.00 berarti semua individu benih mentimun yang ditumbuhkan bersama isolat cendawan tersebut mampu

tumbuh sehat tanpa ada infeksi. Adapun isolat-isolat dengan nilai DSI 1.33 pada hasil uji ini adalah isolat yang menyebabkan satu dari tiga individu benih uji mengalami gejala penyakit atau infeksi ringan pada hipokotilnya. Hal ini berarti isolat dengan nilai ini masuk dalam kategori moderat dan masih bersifat hipovirulen. Hasil uji hipovirulensi menunjukkan bahwa isolat cendawan yang bersifat hipovirulen adalah isolat yang tidak memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan bibit mentimun, bahkan pertumbuhannya lebih baik dibandingkan kontrol.



Gambar 5. Hasil Uji Hipovirulensi isolat cendawan endofit terhadap benih mentimun: (a) isolat hipovirulen CKB3 dengan nilai DSI 0.00, (b) isolat hipovirulen CKA4 dengan nilai DSI 1.33, (c) isolat virulen CKD2 dengan nilai DSI 3.33, dan (d) kontrol

Tabel 6. Hasil Uji Hipovirulensi Terhadap Bakteri Endofit Indigenus

Kode Isolat	DSI*	Dugaan Hipovirulen / Virulen
BKP	4.00	Virulen
BKA	4.00	Virulen
BKT	4.00	Virulen

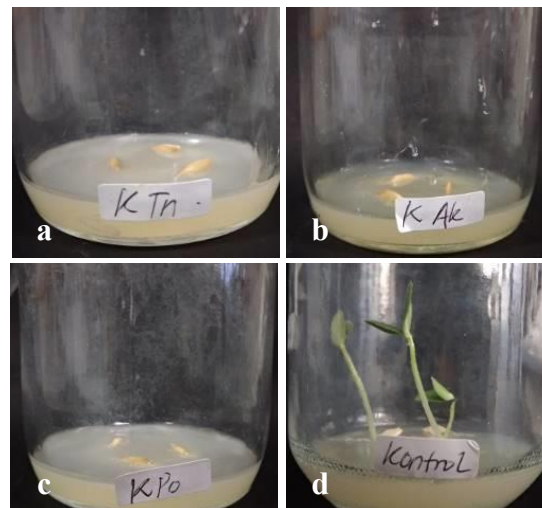
Keterangan: *) Disease Severity Index (DSI) adalah indeks keparahan penyakit yang dinilai dengan ketentuan: 0 = sehat dan tidak ada infeksi pada hipokotil, 1 = satu atau dua bercak coklat muda <0.25 cm, 2 = bercak coklat muda <0.5 cm

dan area kebasahan <10% pada hipokotil, 3 = bercak coklat muda sampai tua >1.0 cm dan kemudian bergabung dengan bercak lainnya dan daerah kebasahan $10\% < x < 100\%$ pada hipokotil (daun belum layu dan hipokotil masih tegar dan putih, 4 = hipokotil bercak hitam, daun layu, dan bibit mati (Cardoso dan Ehandi dalam Worosuryani, 2006).

Perendaman benih merupakan salah satu teknik aplikasi yang biasa dilakukan dalam menggunakan bakteri endofit. Saputra (2016) menyatakan bahwa perendaman benih dengan suspensi bakteri endofit memungkinkan bakteri masuk ke dalam benih melalui lubang alami. Hasil uji hipovirulensi menunjukkan bahwa perlakuan perendaman suspensi isolat bakteri terhadap benih mentimun menyebabkan benih tidak mampu tumbuh normal. Hal ini berarti isolat bakteri tersebut merupakan isolat virulen. Seluruh sampel benih tidak dapat tumbuh hingga hari ke-14 setelah inkubasi. Berdasarkan Tabel 7, nilai DSI pada seluruh isolat adalah bernilai 4.00, meskipun secara visual pada benih tidak terdapat bercak hitam dan tanda kematian benih. Penampakan hasil uji hipovirulensi bakteri endofit yang dilakukan terhadap benih mentimun di botol kultur dengan media NA dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6 merupakan penampakan uji hipovirulensi pada 14 HSI. Berdasarkan gambar di atas, benih uji dengan perendaman masing-masing isolat bakteri tidak berhasil berkecambah normal (Gambar 6a, b, c) jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Gambar 6d). Meski begitu, tidak pula terdapat tanda-tanda benih mengalami kematian, misalnya warna benih berubah menjadi hitam atau kemunculan lendir di sekitar benih. Hal ini diduga sebab bakteri telah masuk ke dalam cadangan makanan (*endosperm*) benih mentimun yang menyebabkan benih tidak berhasil berkecambah. Irawati et al. (2017) menjelaskan kecambah dengan pertumbuhan normal adalah kecambah dengan perkembangan sistem akar,

hipokotil, plumula, dan kotiledon/endosperm yang sempurna tanpa kerusakan dan kelainan pada jaringan-jaringannya.



Gambar 6. Hasil Uji Hipovirulensi isolat bakteri endofit terhadap benih mentimun: (a) isolat BKTN, (b) isolat BKAK, (c) isolat BKPO dan (d) kontrol

Berdasarkan data di atas, bakteri endofit diduga mengalami mutasi karena sudah tidak mendapatkan asupan metabolit tertentu lagi sebagai asupan untuk aktivitas metabolisme setelah dipisahkan dari sel inang asalnya. Kusnadi (2012) melaporkan bahwa mutasi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan yang tidak normal. Gen bakteri yang mengalami mutasi atau perubahan pada satu atau lebih basa DNA-nya disebut Mutan. Salah satu tipe mutan bakteri adalah yang mempunyai defisiensi nutrisi, yaitu membutuhkan medium yang lebih kompleks untuk tumbuhnya ketimbang biakan aslinya. Sholikhin (2014) menyatakan bahwa meskipun bakteri endofit diketahui sebagai agens hayati yang mampu memacu pertumbuhan tanaman (*plant growth promoter*), tidak semua bakteri endofit memiliki efek yang demikian. Damayanti (2010) melaporkan hasil penelitiannya bahwa perlakuan bakteri endofit pada tanaman tomat tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap

pertumbuhan tinggi tanaman. Menurut Sholikhin (2014), hal ini disebabkan oleh adanya interaksi yang kompleks baik yang terjadi antara bakteri endofit dengan tanaman inang, patogen, maupun dengan mikroorganisme lain di dalam tanaman.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Cendawan endofit berhasil diisolasi dari seluruh jaringan tanaman, kecuali polong. Keragaman cendawan endofit tertinggi terdapat pada jaringan akar dan batang, yaitu masing-masing berjumlah 4 isolat. Identitas cendawan endofit yang berhasil diidentifikasi antara lain adalah *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., dan 6 isolat lainnya yang tidak dapat teridentifikasi. Adapun bakteri endofit hanya terisolasi dari jaringan polong, akar, dan tanah. Seluruh bakteri merupakan golongan bakteri Gram negatif.
2. Berdasarkan hasil Uji Hipovirulensi, terhadap 7 isolat cendawan endofit indigenous yang masuk dalam kategori hipovirulen dan 4 isolat lainnya bersifat virulen. Sedangkan semua isolat bakteri endofit yang diuji menunjukkan kategori virulen.

DAFTAR PUSTAKA

Agusta, A. (2009). *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Bandung: ITB Bandung.

Ahmad, R. Z. (2013). Kapang *Paecilomyces lilacinus* dan *Verticillium chlamyosporium* Sebagai Pengendali Hayati Fasciolosis. *Wartazoa*, 23(3), 135–141.

Ata, H., Papuangan, N., & Bahtiar. (2016). Identifikasi Cendawan Patogen pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L). *Bioedukasi*, 4(2), 541–550.

Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minnesota: APS Press.

Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>

Chaelani, S. R. (2010). *Metode Penelitian Penyakit Tumbuhan*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

Damayanti, I. (2010). *Seleksi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Untuk Menekan Kejadian Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia Solanacearum*) Pada Tanaman Tomat* (Skripsi, Institut Pertanian Bogor).

El-Maghraby, O. M. O., Soltan, S. M., Mohammed, R. M., & Mohammed, M. M. (2013). Endophytic fungi of three leguminous plant roots in Egypt. *Journal of Basic & Applied Mycology (Egypt)*, 4, 59–68.

Hardaningsih, S. (2012). Eudarlucacaricis, Mikoparasit yang Berpotensi Menekan Pertumbuhan Jamur Karat Pada Tanaman Kacang-Kacangan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Tanaman Aneka Kacang Dan Umbi*.

Irawati, A. F. C., Mutaqin, K. H., Suhartono, M. T., Sastro, Y., Sulastri, N., & Widodo, N. (2017). Eksplorasi dan Pengaruh Cendawan Endofit yang Berasal dari Akar Tanaman Cabai Terhadap Pertumbuhan Benih Cabai Merah. *Jurnal Hortikultura*, 27(1), 105. <https://doi.org/10.21082/jhort.v27n1.2017.p105-112>

Istifadah, N., & Sari, I. P. (2017). Efek Jamur Endofit Asal Daun dan Akar Kacang Tanah terhadap Pertumbuhan dan Penghambatan

- Patogen Inangnya. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 1(2), 61–69.
- Kusnadi. (2012). *Common Text Mikrobiologi*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Nurhayati. (2010). *Senarai Istilah-Istilah Mikologi*. Palembang: Universitas Sriwijaya.
- Purwantisari, S.-, & Hastuti, R. B. (2012). Isolasi dan Identifikasi Jamur Indigenous Rhizosfer Tanaman Kentang dari Lahan Pertanian Kentang Organik di Desa Pakis, Magelang. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(2), 45. <https://doi.org/10.14710/bioma.11.2.45-53>
- Riniarsi, D. (2016). *Outlook Komoditas Pertanian Tanaman Pangan Kedelai*.
- Safitri, D. A. (2017). *Pengujian Antagonisme Bakteri Endofit Terhadap Patogen Penting Tanaman Nanas (Ananas comosus L.)* (Skripsi, universitas Lampung).
- Sanjaya, Y., Nuhaeni, H., & Halima, M. (2010). Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi Jamur Entomopatogen Dari Larva Spodoptera Litura (Fabricius). *Bionatura: Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 12(3), 136–141.
- Saputra, M. (2016). *Aplikasi Bakteri Endofit Dengan Metode Perendaman Benih, Penyiraman Pada Tanah, Dan Pencelupan Akar Terhadap Meloidogyne spp Pada Tanaman Tomat* (Skripsi, Institut Pertanian Bogor).
- Sastrahidayat, I. R. (2011). *Fitopatologi (Ilmu Penyakit Tumbuhan)*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Sholikhin, I. (2014). *Keefektifan Bakteri Endofit Sebagai Agens Hayati Terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri (Xanthomonas Oryzae Pv. Oryzae) Pada Padi* (Skripsi, Institut Pertanian Bogor).
- Sneh, B., Yamoah, E., & Stewart, A. (2004). Hypovirulent Rhizoctonia spp. isolates from New Zealand Soils Protected Radish Seedlings Against damping-off caused by Rhizoctonia solani. *New Zealand Plant Protection*, 57, 54–58.
- Sudantha, I. M. (2009). *Pemanfaatan Jamur Endofit dan Saprofit Antagonis Sebagai Agens Pengendali Hayati Patogen Tular Tanah Untuk Meningkatkan Kesehatan Dan Hasil Tanaman*.
- Supriyanto, Priyatmojo, A., & Arwiyanto, T. (2009). Penapisan PGPF Untuk Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Lidah Buaya (Aloe vera) di Tanah Gambut. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 15(2), 71–82.
- Trizelia, Winarto, & Tanjung, A. (2017). Keanekaragaman Jenis Cendawan Endofit pada Tanaman Gandum (Triticum aestivum) yang Berpotensi sebagai Bioinsektisida. Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia (Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon)*, 433–437.
- Waruwu, A., Soekarno, B., & Munif, A. (2016). "Metabolite of Endophytic Fungi Isolated from Rice as an Alternative to Control Seed-borne Pathogenic Fungi on Rice ". *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 12(2), 53–61. <https://doi.org/10.14692/jfi.12.2.53>
- Worosuryani, C., Priyatmojo, A., & Wibowo, A. (2006). Uji Kemampuan Jamur Tanah yang diisolasi dari lahan pasir sebagai PGPF (Plant Growth Promoting Fungi). *Agrosains*, 19(2), 179–191.

Yulianti, T. (2012). Menggali Potensi Endofit untuk Meningkatkan Kesehatan Tanaman Tebu Mendukung Peningkatan Produksi Gula. *Perspektif*, 11(2), 113–123.