

Nematoda Puru Akar pada Seledri (*Apium graveolens* L.) dan Pengendaliannya Menggunakan Bakteri Endofit Secara In Vitro

*Rootknot Nematodes in Celery (*Apium graveolens* L.) and Its in Vitro Control Using Endophytic Bacteria*

Fitrianiingrum Kurniawati^{1*}, Neng Tipa Nursipa¹, Abdul Munif¹

¹Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

*Email korespondensi: fitrianiingrum@apps.ipb.ac.id

Diterima: 07 Januari 2020 / Disetujui: 18 Maret 2020.

ABSTRACT

Root knot nematodes can cause disease on celery. Endophytic bacteria as biocontrol agents is an alternative for controlling nematodes. This research aimed to identify plant-parasitic nematodes that associated with celery in Cikole Village, Cihideung, and Ciputri and control these nematodes using endophytic bacteria. Nematodes were extracted from soil and root samples by flotation-centrifugation and mist chamber techniques. Root knot nematodes were identified based on their morphological characters and were characterized by the female perineal pattern. Endophytic bacteria were isolated from 'kenikir' on TSA 20%. Bacteria obtained were subsequent hypersensitive test, hemolysis test and in vitro test. Four species of root knot nematodes, which were *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, and *M. hapla* were identified. Eleven bacteria isolates showed negative reaction on hypersensitive test and hemolysis test. Isolates with code EB45, EB48, EB28, EB13, EB49 caused nematodes mortality with the highest percentage of 53.74%, 51.41%, 49.45%, 47.71%, and 47.69% at 12 hours after in vitro treatment.

Keywords: celery, endophytic bacteria, *Meloidogyne*, root knot nematodes

ABSTRAK

Nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.) merupakan salah satu patogen penyebab penyakit pada seledri. Pengendalian nematoda puru akar menggunakan bakteri endofit merupakan salah satu alternatif pengendalian yang dapat dipertimbangkan. Tujuan dari penelitian ini mengidentifikasi nematoda puru akar yang berasosiasi dengan tanaman seledri di Desa Cikole, Cihideung, dan Ciputri serta pengendaliannya menggunakan bakteri endofit. Ekstraksi nematoda menggunakan metode flotasi-sentrifugasi dan pengabutan. Identifikasi nematoda berdasarkan karakteristik morfologi, dan karakter pola perineal nematoda betina. Bakteri endofit diisolasi dari tanaman kenikir. Bakteri endofit yang didapatkan selanjutnya di uji hipersensitif, uji aktivitas hemolisis dan uji in vitro. Empat spesies nematoda puru akar, yaitu *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* dan *M. hapla* teridentifikasi berdasarkan karakter pola perineal. Sebanyak 11 isolat menunjukkan reaksi negatif uji hipersensitif dan uji aktivitas hemolisis. Isolat dengan kode EB45, EB48, EB28, EB13, EB49 merupakan isolat dengan jumlah mortalitas nematoda terbanyak dengan persentase berturut-turut 53,74%, 51,41%, 49,45%, 47,71%, dan 47,69% pada 12 jam setelah perlakuan pada uji in vitro.

Kata kunci: bakteri endofit, *Meloidogyne*, nematoda puru akar, seledri

PENDAHULUAN

Tanaman seledri (*Apium graveolens* L.) merupakan komoditas sayuran bernilai ekonomi yang sering digunakan sebagai penyedap makanan, bumbu masakan dan penghias hidangan (Kasahara dan Hemmi 1995). Salah satu kendala dalam budi daya tanaman seledri ialah gangguan nematoda parasit akar yang dapat menyebabkan penyakit yang serius dan menimbulkan kehilangan hasil mencapai 70% di Michigan Amerika Serikat (Melakeberhan dan Wang 2012).

Beberapa jenis nematoda dilaporkan dapat menyebabkan penyakit pada tanaman seledri. Penelitian

Rosya dan Winarto (2013) melaporkan bahwa di Sumatera Barat nematoda yang menyerang tanaman seledri yaitu *Helicotylenchus*, *Trichodorus*, *Longidorus*, *Xiphinema* dan nematoda puru akar (NPA) *Meloidogyne* spp.. Luc *et al.* (2001) menyatakan bahwa tanaman seledri merupakan inang dari *M. incognita*, *M. javanica*, dan *M. thamesi*. Spesies *Meloidogyne* yang telah dilaporkan berasosiasi dengan seledri di Indonesia adalah *M. incognita*, *M. arenaria*, dan *M. javanica* (Kurniawati *et al.* 2017).

Meloidogyne spp. merupakan nematoda yang berkembang sangat cepat dan mempunyai daya tekan tinggi terhadap pertumbuhan tanaman dengan gejala khas terlihat

pada akar, yaitu berupa bintil-bintil yang disebut dengan puru akar (Whitehead 1998). Selain terbentuknya puru akar, akar lebih sedikit, daun mengalami klorosis, layu, banyak yang gugur, dan tanaman kerdil, dan serangan yang berat menyebabkan tanaman mati (Prasasti 2012). Pengendalian nematoda parasit tanaman yang biasa dilakukan yaitu dengan menggunakan nematisida, agens antagonis, dan pergiliran tanaman (Luc *et al.* 2001). Penggunaan pestisida sintetik dinilai dapat mencemari lingkungan dan mengganggu keseimbangan ekosistem apabila penggunaannya tidak terkontrol. Alternatif pengendalian hama dan penyakit tanaman yang ramah lingkungan untuk mendukung kehidupan yang lebih sehat perlu terus dikembangkan. Hal ini sejalan dengan salah satu konsep pengendalian hama terpadu (PHT), yaitu pengendalian hayati dengan memanfaatkan komponen biologi. Konsep ini merupakan salah satu pilihan teknologi pengendalian yang perlu dikembangkan karena rendahnya dampak negatif terhadap lingkungan, murah dan berkelanjutan (*sustainable*) (Barker dan Koenig 1998). Salah satu alternatif pengendalian yang dapat digunakan yaitu penggunaan bakteri endofit.

Bakteri endofit merupakan bakteri saprofit yang hidup dan berasosiasi dengan jaringan tanaman yang sehat tanpa menimbulkan gejala penyakit. Keberadaan bakteri-bakteri endofit di dalam jaringan tanaman berperan dalam perbaikan pertumbuhan tanaman (*plant growth promotion*) karena kemampuannya dalam mensintesis dan memobilisasi fosfat, hormon pertumbuhan dan enzim serta berperan dalam ketahanan tanaman sebagai agens hayati. Bakteri endofit diduga mampu memproduksi antibiotik dan senyawa antimikroba lainnya yang sangat berperan dalam menginduksi ketahanan tanaman terhadap serangan penyakit dan hama. Bakteri endofit dapat ditemukan di berbagai jenis tanaman seperti tanaman hortikultura, perkebunan, pangan, dan kehutanan (Munif *et al.*, 2012). Munif dan Harni (2011) berhasil mengisolasi bakteri endofit dari tanaman lada dan beberapa diantaranya terbukti efektif dalam menekan jumlah puru pada akar dan populasi juvenil nematoda *M. incognita* di dalam tanah hingga mencapai 90%.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi NPA yang berasosiasi dengan tanaman seledri di Desa Cikole Kecamatan Lembang, Desa Cihideung Kecamatan Parongpong Bandung Barat dan Desa Ciputri Kecamatan Pacet Cianjur dan mengetahui potensi bakteri endofit asal tanaman kenikir dalam mengendalikan NPA.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel dan Pengamatan Gejala

Pengambilan sampel dilakukan dengan metode purposif di lahan seledri milik petani di Desa Cikole, Desa Cihideung dan Desa Ciputri. Sampel yang diambil berupa tanah dan akar tanaman seledri. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan menggunakan bor tanah (diameter 5 cm) pada kedalaman 15 cm dengan jarak 10 cm dari batang tanaman. Sampel tanah kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan amplop berwarna coklat yang telah diberi label dan dibawa ke laboratorium. Pengambilan

sampel akar dilakukan dengan mencabut akar tanaman seledri sampai bagian pangkal. Sampel akar kemudian dimasukkan dalam kantong plastik dan amplop berwarna coklat yang telah diberi label dan dibawa ke laboratorium. Selain itu, dilakukan pendataan untuk mendapatkan informasi awal mengenai tipe gejala tanaman yang disebabkan oleh nematoda *Meloidogyne* spp.

Ekstraksi Nematoda dari Sampel Tanah

Sampel tanah dipisahkan dari gumpalan. Tanah yang halus diambil sebanyak 100 ml dan dicampurkan dengan 800 ml air dalam ember A, lalu diendapkan selama 1 menit. Air dari ember A disaring ke dalam ember B dengan menggunakan saringan kasar. Air dalam ember B disaring diatas saringan bertumpuk dengan posisi miring 30°, yaitu berturut-turut saringan 20 mesh, 50 mesh dan 400 mesh. Substrat tanah dan nematoda yang tertinggal di saringan 400 mesh dituang ke dalam tabung sentrifuse. Substrat di sentrifugasi selama ± 5 menit dengan kecepatan 1 500 rpm, kemudian supernatan dibuang. Endapan ditambahkan dengan larutan gula 40% dan diaduk sampai merata. Selanjutnya disentrifugasi selama ± 1 menit dengan kecepatan 1 700 rpm. Supernatan yang terbentuk disaring dengan saringan 500 mesh dan dibilas dengan air yang mengalir sehingga diperoleh suspensi nematoda, lalu dimasukkan dalam botol koleksi untuk diamati dan diidentifikasi (Caveness & Jensen 1955).

Ekstraksi Nematoda dari Sampel Akar

Nematoda diekstraksi dari sampel akar dengan menggunakan metode pengabutan (*mist chamber*). Akar seledri terlebih dahulu dibersihkan kemudian di potong-potong sepanjang ± 1 cm dan ditimbang sebanyak 5 g. Akar yang telah di potong-potong disimpan diatas saringan kasar, lalu diletakkan diatas corong yang dibawahnya terdapat gelas plastik untuk penampung nematoda, kemudian disimpan di ruang pengabutan dan dibiarkan selama 48 jam. Setelah itu gelas plastik yang berisi nematoda disaring dengan menggunakan saringan 400 mesh dengan posisi saringan agak miring. Nematoda yang bertahan dalam saringan dipindahkan dan disimpan dalam botol koleksi lalu dimasukkan dalam kulkas untuk pengamatan selanjutnya (Hutagalung 1988).

Pembuatan Preparat Nematoda Semipermanen

Preparat semi permanen dibuat berdasarkan metode Goodey (1937) yang telah dimodifikasi. Lingkaran parafin dibuat diatas gelas objek dengan menggunakan bor gabus (*cork borer*) dengan ketebalan yang sama, kemudian ditetaskan laktofenol pada tengah-tengah lingkaran parafin. Sebanyak 3-5 ekor nematoda diletakkan pada larutan laktofenol dengan posisi yang sama sejajar, selanjutnya ditutup dengan cover glass. Preparat kemudian dipanasi sampai cincin parafin meleleh kembali dan *cover glass* merekat bersama parafin. Pinggir *cover glass* direkatkan dengan kuteks transparan.

Identifikasi Morfologi

Pengamatan secara morfologi dilakukan dengan melihat ciri dari tiap fase perkembangan nematoda tersebut. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan kamera. Identifikasi dilakukan dengan mengacu pada buku identifikasi nematoda yaitu *Plant Parasitic Nematodes: a Pictorial Key to Genera* (May & Lyon 1996) dan *Nematology Laboratory Investigations Morphology And Taxonomy* (Eisenback 2003).

Penghitungan Nematoda

Penghitungan jumlah nematoda dari sampel tanah dan akar dilakukan di bawah mikroskop stereo dengan perbesaran 40x. Jumlah sampel tiap penghitungan sebanyak 1 ml dan dilakukan sebanyak 5x ulangan.

Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dari akar dan batang tanaman kenikir dilakukan dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Hallmann et al. (1997) dengan modifikasi. Masing-masing sampel akar dan batang dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dikeringkan dengan kertas tisu dan ditimbang sebanyak 2 g, selanjutnya akar disterilisasi permukaan dengan menggunakan NaOCl 3% yang telah diberi 0.01% Tween 20 selama 3 menit kemudian akar dibilas dengan air steril sebanyak 4 kali. Untuk mengetahui apakah sterilisasi permukaan berhasil atau tidak, diuji dengan meletakkan akar dan batang yang sudah disterilkan ke dalam cawan petri yang sudah diisi media *Tryptic Soy Agar* (TSA) 20%, dan diinkubasi selama 48 jam. Akar maupun batang yang masih ditemukan mikroorganisme yang tumbuh pada permukaan akar, berarti sterilisasi gagal dan bakteri yang diperoleh tidak dapat digunakan. Perlakuan ini bertujuan agar bakteri yang diperoleh betul-betul berasal dari jaringan akar dan bukan dari permukaan akar (kontaminan). Akar yang sudah steril dihancurkan dengan mortar steril sampai halus. Ekstrak akar disuspensikan dengan 9 ml air steril dalam tabung reaksi. Suspensi dikocok dengan menggunakan vorteks, selanjutnya dipindahkan sebanyak 1 ml suspensi ke dalam 9 ml air steril pada tabung reaksi. Dengan demikian diperoleh tingkat pengenceran 10^{-2} dan selanjutnya dilakukan pengenceran dengan cara yang sama dan diperoleh suspensi 10^{-3} . Selanjutnya dari pengenceran 10^{-3} diambil 0.1 ml suspensi untuk ditumbuhkan pada media TSA 20%, diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar. Koloni bakteri yang tumbuh dimurnikan pada media TSA 100%. Bakteri yang sudah murni disimpan di dalam *ependorf* yang telah berisi media air steril kemudian disimpan pada suhu -80°C .

Uji Hipersensitif

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui potensi patogenesitas bakteri endofit. Tanaman yang digunakan dalam uji ini adalah tanaman tembakau sehat berumur 3-4 bulan. Isolat bakteri endofit yang akan diuji dibiakkan pada media TSA 100% dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah itu, sebanyak 20 ml akuades steril dituangkan pada biakan dan bakteri dipanen dengan cara melurukannya menggunakan jarum inokulasi. Bakteri endofit yang telah diencerkan tersebut kemudian disuntikkan dengan menggunakan jarum suntik pada daun tembakau dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang bereaksi positif akan menunjukkan gejala nekrosis pada daun tembakau. Bakteri yang bereaksi negatif tidak menunjukkan gejala kerusakan pada daun tembakau dan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Uji Aktivitas Hemolisis

Isolat bakteri endofit ditumbuhkan pada media agar darah yang diperoleh dari Lab Bakteriologi Tumbuhan Departemen Proteksi Tanaman Institut Pertanian Bogor dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Adanya aktivitas hemolisis ditandai dengan adanya zona hemolisis pada plat agar darah.

Uji Bakteri Endofit terhadap Nematoda Parasit secara *In Vitro*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibiosis bakteri endofit yang diisolasi terhadap juvenil 2 (j2) nematoda parasit. Uji ini dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml suspensi nematoda yang berisi ± 100 ekor larva nematoda ke dalam 5 ml suspensi bakteri endofit. Suspensi bakteri endofit dibuat dengan cara sebanyak 20 ml akuades steril dituangkan pada biakan isolat bakteri endofit yang berumur 48 jam dan dipanen dengan cara melurukannya menggunakan jarum inokulasi. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan untuk setiap perlakuan. Perhitungan jumlah mortalitas nematoda dilakukan 2, 6, dan 12 jam setelah perlakuan.

Analisis Data

Rancangan percobaan yang dilakukan pada uji *in vitro* adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh dianalisis secara statistika dengan menggunakan uji Duncan pada program SAS 9.1.3 dengan selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Lokasi Pengambilan Sampel dan Gejala yang Ditemukan

Suhu pada pengambilan sampel di lokasi pengambilan sampel berturut-turut berkisar $19-24^{\circ}\text{C}$, $18-22^{\circ}\text{C}$, $18-26^{\circ}\text{C}$. Jenis tanah pada ketiga lokasi memiliki tipe yang sama, yaitu tipe andosol. Varietas seledri yang banyak dibudidayakan oleh petani yaitu varietas lokal.

Gejala sekunder terlihat di atas permukaan tanah, yaitu pertumbuhan tanaman lambat, gejala defisiensi hara seperti kerdil, daun menguning (klorosis), dan layu pada cuaca panas (Dropkin 1991). Gejala sekunder di lahan terdapat daun berwarna kuning atau klorosis (Gambar 2a dan 2b) dan pada saat tanaman dicabut terdapat puru yang banyak dengan rambut akar pada akar seledri tersebut (Gambar 2c).

Terbentuknya puru pada akar disebabkan oleh *Meloidogyne* spp. yang dapat menghasilkan sekresi protease sehingga mengubah protein di dalam jaringan akar menjadi asam amino. Salah satu asam amino yang dihasilkan yaitu triptofan yang diduga dapat bertindak sebagai perangsang terjadinya hormon IAA. Zat tumbuh tersebut merangsang terjadinya hiperplasia (pertambahan banyak sel yang tidak normal) dan hipertropi (pertambahan besar sel yang tidak normal) (Mulyadi 2009).

***Meloidogyne* spp. yang Ditemukan pada Sampel Tanah dan Akar**

Rata-rata jumlah populasi nematoda parasit di Desa Cikole yaitu 444 ekor *Meloidogyne* spp., di Desa Cihideung lahan monokultur yaitu 330 ekor *Meloidogyne* spp, dan pada lahan tumpang sari rata-rata jumlah populasi nematoda parasit yaitu 410 ekor *Meloidogyne* spp. Rata-rata jumlah populasi nematoda parasit di Desa Ciputri lahan monokultur yaitu 200 ekor *Meloidogyne* spp., pada lahan tumpang sari dengan bawang daun rata-rata jumlah populasi nematoda parasit yaitu 410 ekor *Meloidogyne* spp, serta rata-rata jumlah populasi nematoda *Meloidogyne* spp. dari sampel akar Desa Cihideung lahan monokultur yaitu 508 ekor, tumpang sari 2 068 ekor *Meloidogyne* spp. Rata-rata jumlah populasi nematoda parasit di Desa Ciputri lahan monokultur yaitu 400 ekor *Meloidogyne* spp, dan tumpang sari 1290 ekor.

Menurut Jayasinghe (2002), juvenil stadia 2 (J2) *Meloidogyne* merupakan stadia paling infeksiif untuk melakukan penetrasi ke dalam perakaran. Setelah J2 masuk

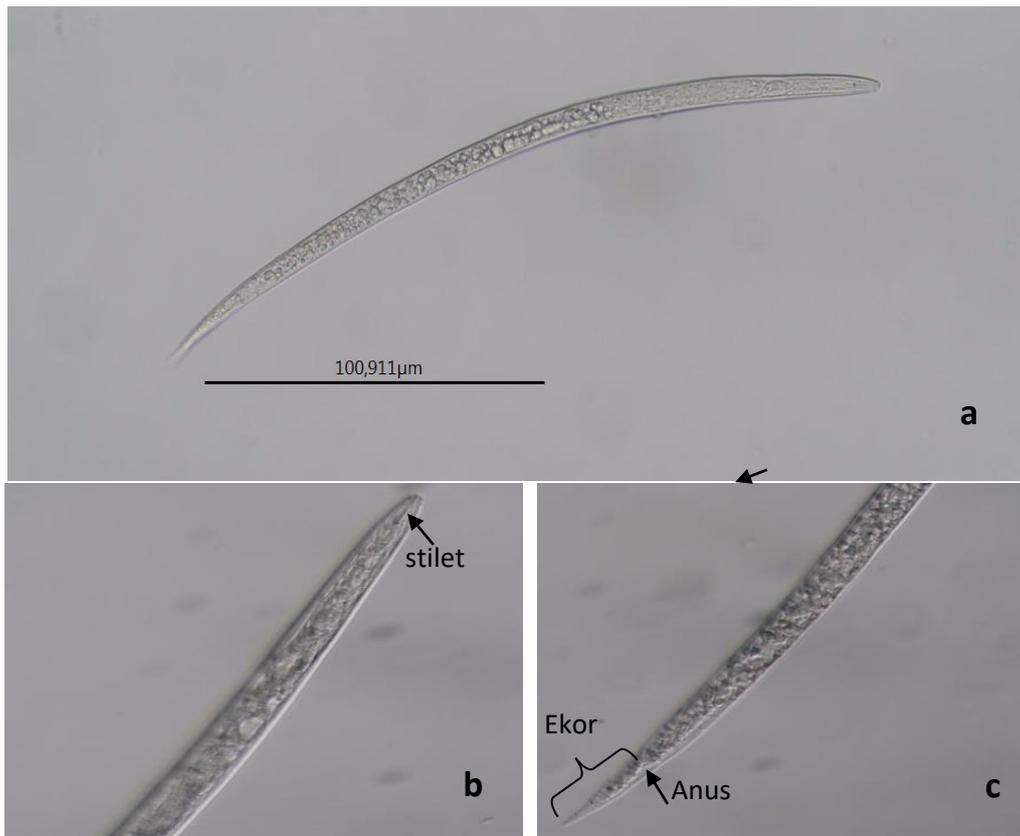
kedalam akar, J2 bergerak di antara sel-sel sampai di tempat dekat silinder pusat. Di tempat tersebut nematoda menetap dan menyebabkan perubahan sel-sel yang menjadi makanannya (Dropkin 1991). Panjang tubuh J2 yang ditemukan yaitu 100,911µm, stilet tipe stomatostilet dengan panjang 9,87 µm, basal knob *offset*, tubuh *Meloidogyne* bervariasi tergantung dari spesies. Fase istirahat *Meloidogyne* juvenil 2 memperlihatkan bentuk tubuh yang relatif lurus, tipe bibir tidak set-off atau tidak memiliki lengkungan bibir, anulasi halus, dan ujung ekor terlihat bergerigi (Gambar 2).

Karakter yang paling sering digunakan untuk identifikasi morfologi spesies *Meloidogyne* spp. betina adalah menggunakan pola perineal. Pola perineal tersebut terletak di bagian posterior nematoda betina dewasa. Hasil identifikasi pola perineal menunjukkan adanya empat spesies *Meloidogyne* spp. di kelima lokasi pengambilan sampel. Keempat spesies tersebut adalah *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, dan *M. hapla*. Masing-masing spesies nematoda betina tersebut dapat dikenali berdasarkan ciri khas dari pola perineal yang dimiliki. Perbedaan pola perineal dari keempat spesies dapat dilihat pada Gambar 3.

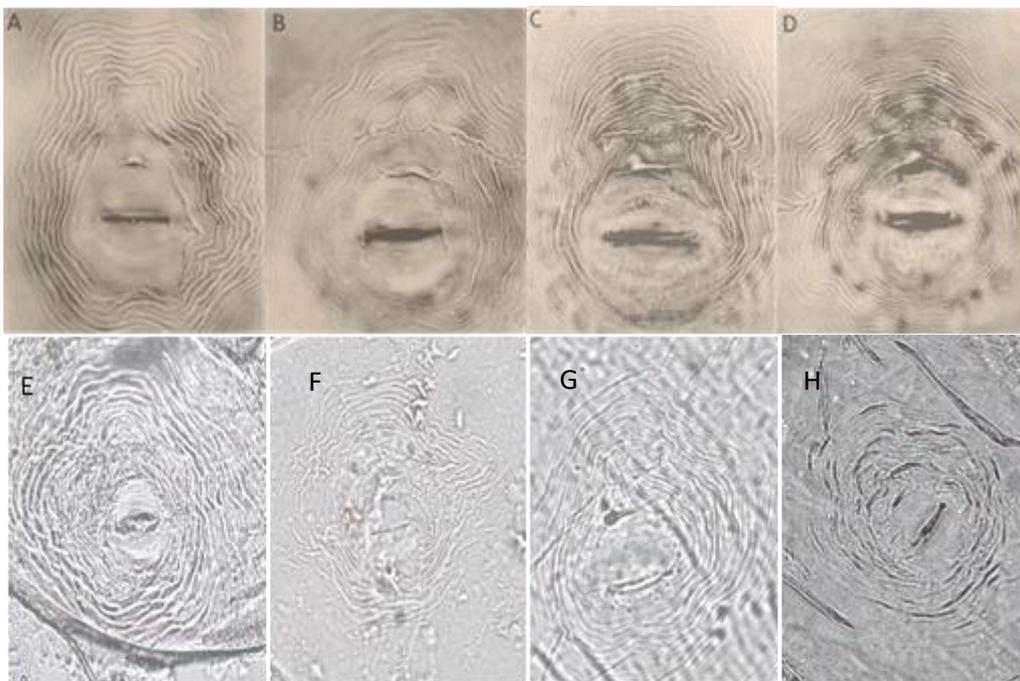
M. incognita mempunyai ciri khas lengkung dorsal yang tinggi dan menyempit, sedangkan bagian paling luar sedikit melebar dan agak mendatar. Pola striasi kasar, bergelombang kadang zig-zag, tidak memiliki garis lateral dan bagian stria terlihat jelas (Gambar 3a dan 3e). *M. javanica* mempunyai ciri khas berupa garis lateral yang terputus dan seperti memisahkan bagian lengkung dorsal dan ventral. Striasi kasar, halus sampai sedikit bergelombang (Gambar 3b dan 3f). *M. arenaria* mempunyai ciri khusus berupa lengkung dorsal yang rendah dan membulat, tidak terdapat garis pada bidang lateral. Striasi kasar, halus hingga sedikit bergelombang. Bagian lengkung striasi bercabang di dekat garis lateral dengan bagian striasi lebih mendatar (Gambar 3c dan 3g). *M. hapla* memiliki ciri khas terdapat tonjolan-tonjolan seperti duri pada zona ujung ekor (Gambar 3d dan 3h).



Gambar 1 Gejala tanaman seledri yang terserang nematoda parasit. a) Gejala seledri di lapangan, b) Gejala sekunder, c) Gejala primer



Gambar 2. Morfologi *Meloidogyne* juvenil. a) Seluruh tubuh (perbesaran 20x10), b) bagian tubuh anterior (Perbesaran 40x10), dan c) bagian tubuh posterior (Perbesaran 40x10).



Gambar 3. Pola perineal *Meloidogyne* betina dewasa. a) *M. incognita*, b) *M. arenaria*, c) *M. javanica*, d) *M. hapla* (Eisenback *et al.* 1981). Hasil identifikasi berdasarkan morfologi pola perineal e) *M. incognita*, f) *M. javanica*, g) *M. arenaria*, h) *M. hapla*

Isolasi Bakteri Endofit

Bakteri yang berhasil diisolasi sebanyak 101 isolat yang terdiri dari 51 isolat berasal dari akar, dan 50 isolat dari batang. Isolat tersebut di murnikan pada media TSA 100% dan disimpan di dalam lemari es pada suhu -40C (Gambar 4).

Uji Reaksi Hipersensitif

Sebanyak 101 isolat bakteri endofit selanjutnya dilakukan pengujian hipersensitif pada tanaman tembakau. Hasil pengujian menunjukkan 29 isolat tidak menunjukkan gejala nekrosis pada daun tembakau (reaksi negatif), sedangkan 72 isolat menunjukkan gejala (reaksi positif) (Tabel 3). Reaksi ini adalah respon tanaman terhadap munculnya patogen di dalam jaringan tanaman yang merupakan usaha untuk menghambat pertumbuhan patogen. Reaksi hipersensitif dipengaruhi oleh gen *hrp* yang umum terdapat pada bakteri gram negatif patogen tanaman, seperti kelompok *Xanthomonas* sp. (Zhu *et al.* 2000). Bakteri yang tidak menunjukkan gejala nekrosis pada daun tembakau (reaksi negatif) digunakan untuk pengujian selanjutnya (Gambar 5).

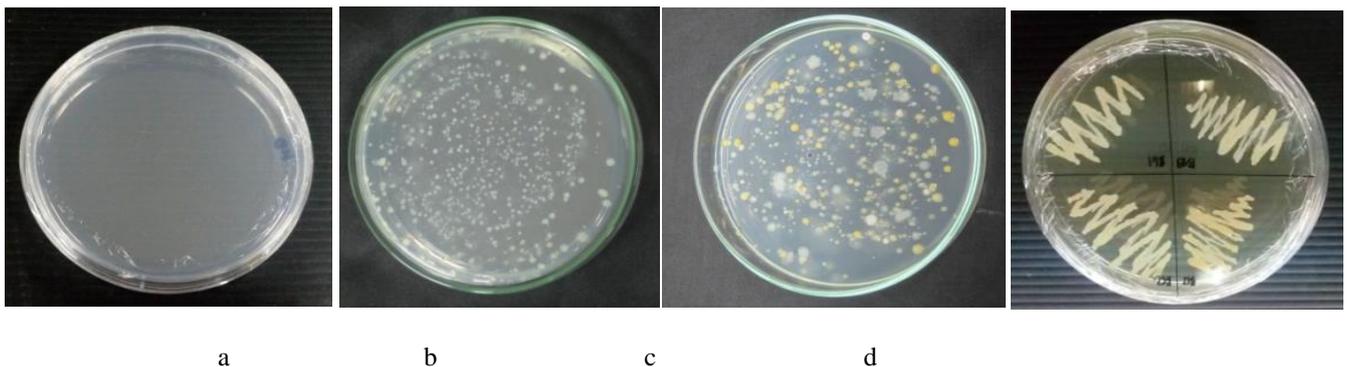
Lelliott dan Stead (1987) menyebutkan bahwa kebanyakan bakteri patogen tanaman dapat menginduksi respon hipersensitif jika diinjeksikan ke dalam jaringan tanaman inang yang tidak rentan dalam waktu 24-72 jam setelah inokulasi. Menurut Yang He (1996) uji hipersensitif merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi dengan cepat potensi patogenitas suatu bakteri terhadap tanaman. Reaksi uji hipersensitif terjadi dalam waktu 24-48 jam dan terlokalisasi. Membran seluler pada

daun tanaman tembakau yang mengalami kontak dengan bakteri patogen akan hancur dan nekrosis. Respons tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang kontak dengan daun tanaman tembakau berpotensi sebagai patogen tumbuhan (Zhu *et al.* 2000). Berdasarkan uji yang telah dilakukan, isolat yang negatif hipersensitif berasal dari bagian akar berjumlah 15 isolat. Isolat yang berasal dari bagian batang yang negatif uji hipersensitif berjumlah 14 isolat (Tabel 3).

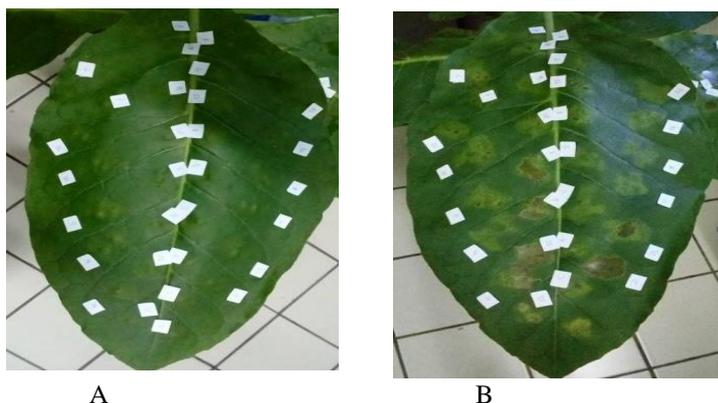
Uji Aktivitas Hemolisis

Bakteri yang tidak menunjukkan gejala nekrotik pada uji hipersensitif digunakan untuk uji agar darah untuk melihat keamanannya terhadap kesehatan mamalia. Terdapat 29 isolat bakteri endofit yang diuji dengan metode ini. Berdasarkan hasil uji diketahui terdapat 18 isolat bakteri endofit yang menunjukkan reaksi positif (Gambar 6) dan 11 isolat menunjukkan reaksi negatif. Prinsip pengujian hemolisis adalah melihat perubahan warna media ketika bakteri ditumbuhkan di atas medium padat darah segar (Das *et al.* 2008). Munculnya perubahan warna dari merah darah menjadi warna gelap (transparan tidak berwarna) telah tampak disekitar koloni bakteri tumbuh. Hal ini menunjukkan aktivitas bakteri mampu melisis sel-sel darah merah selama 48 jam waktu inkubasi.

Bakteri yang menghasilkan toksin hemolisin tidak digunakan pada pengujian selanjutnya karena telah diketahui supernatan dari α hemolisin bersifat sangat *cytotoxic* terhadap granulocytes, monocytes, dan lymphocytes manusia (Lopes *et al.* 2010). *Serratia marcescens* diketahui mampu menyebabkan hemolisis pada eritrosit manusia (Hertle *et al.* 1999).



Gambar 4. Hasil isolasi dari akar dan batang kenikir pada media TSA. a) kontrol, b) isolat akar, c) isolat batang, d) bakteri yang di remajakan pada media TSA 100%



Gambar 5 Hasil uji reaksi hipersensitif. A) Isolat bakteri yang tidak menunjukkan gejala nekrosis (reaksi negatif), B) Isolat bakteri endofit yang menunjukkan gejala nekrosis (reaksi positif) pada uji hipersensitif menggunakan daun tembakau

Tabel 3. Isolat bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman kenikir dan hasil uji hipersensitif pada tanaman tembakau

Kode isolat	Uji hipersensitif
EA1	Positif
EA2	Positif
EA3	Positif
EA4	Positif
EA5	Positif
EA6	Positif
EA7	Positif
EA8	Positif
EA9	Positif
EA10	Positif
EA11	Positif
EA12	Positif
EA13	Positif
EA14	Positif
EA15	Positif
EA16	Positif
EA17	Positif
EA18	Positif
EA19	Positif
EA20	Positif
EA21	Positif
EA22	Positif
EA23	Positif
EA24	Positif
EA25	Positif
EA26	Positif
EA27	Positif
EA28	Positif
EA29	Positif
EA30	Positif

EA31	Negatif
EA32	Negatif
EA33	Positif
EA34	Positif
EA35	Negatif
EA36	Negatif
EA37	Negatif
EA38	Negatif
EA39	Positif
EA40	Negatif
EA41	Positif
EA42	Positif
EA43	Negatif
EA44	Positif
EA45	Positif
EA46	Negatif
EA47	Positif
EA48	Negatif
EA49	Positif
EA50	Positif
EA51	Positif
EB1	Positif
EB2	Positif
EB3	Negatif
EB4	Negatif
EB5	Positif
EB6	Positif
EB7	Negatif
EB8	Negatif
EB9	Positif
EB10	Negatif
EB11	Positif
EB12	Negatif
EB13	Negatif
EB14	Negatif
EB15	Positif
EB16	Positif
EB17	Positif
EB18	Positif
EB19	Positif
EB20	Positif
EB21	Negatif
EB22	Negatif
EB23	Positif
EB24	Positif

EB25	Positif
EB26	Positif
EB27	Negatif
EB28	Negatif
EB29	Negatif
EB30	Negatif
EB31	Positif
EB32	Positif
EB33	Positif
EB34	Positif
EB35	Positif
EB36	Negatif
EB37	Positif
EB38	Positif
EB39	Negatif
EB40	Positif
EB41	Positif
EB42	Positif
EB43	Positif
EB44	Positif
EB45	Negatif
EB46	Positif
EB47	Positif
EB48	Negatif
EB49	Negatif
EB50	Positif



Gambar 6. Hasil uji aktivitas hemolisis. a) isolat bakteri yang diuji agar darah, b) isolat yang menunjukkan hemolisis, c) isolat yang tidak menghasilkan hemolisis

Tabel 4 Isolat bakteri endofit hasil uji aktivitas hemolisis

Kode isolat	Uji agar darah	Kode isolat	Uji agar darah
EA3	Positif	EB12	Positif
EA3	Negatif	EB13	Negatif
EA3	Positif	EB14	Positif
EA3	Positif	EB21	Positif
EA3	Positif	EB22	Positif
EA3	Positif	EB27	Positif
EA4	Negatif	EB28	Negatif
EA4	Positif	EB29	Positif
EA4	Positif	EB30	Negatif
EA4	Positif	EB36	Negatif
EB3	Negatif	EB39	Positif
EB4	Negatif	EB45	Negatif
EB7	Positif	EB48	Negatif
EB8	Positif	EB49	Negatif
EB1	Positif		

Tabel 5 Pengaruh perlakuan bakteri endofit terhadap jumlah mortalitas nematoda parasit secara *in vitro*

No	Nama isolat	Mortalitas		
		2 jam	6 jam	12 jam
1	Kontrol	2.34 d	2.34 g	2.34 g
2	EA32	13.19 bc	21.91 de	33.29 e
3	EA40	12.04 bcd	28.70 cd	39.33 cde
4	EB3	6.40 cd	13.55 ef	21.24 f
5	EB4	8.89 bcd	32.26 bc	37.03 de
6	EB13	14.75 bc	41.30 a	47.71 abc
7	EB28	8.98 bcd	22.25 de	49.45 ab
8	EB30	7.59 bcd	12.17 f	25.06 f
9	EB36	10.55 bcd	29.46 cd	44.17 bcd
10	EB45	25.54 a	39.55 ab	53.74 a
11	EB48	12.07 bcd	19.12 ef	51.41 ab
12	EB49	17.06 ab	28.59 cd	47.69 abc

Uji Bakteri Endofit terhadap Mortalitas Nematoda Parasit secara *In Vitro*

Uji *in vitro* dilakukan untuk mengetahui pengaruh langsung bakteri terhadap nematoda parasit. Isolat yang digunakan dalam uji ini merupakan isolat dari hasil uji sebelumnya yaitu EA32, EA40, EB3, EB4, EB13, EB28, EB30, EB36, EB45, EB48, EB49. Tabel 5 menunjukkan bahwa perlakuan dengan isolat bakteri endofit memberikan pengaruh terhadap peningkatan jumlah nematoda parasit yang mengalami kematian dibandingkan dengan kontrol. Kecuali pada perlakuan 2 jam isolat dengan kode EA40, EB3, EB28, EB30, EB36, EB48 tidak berbeda nyata dengan kontrol.

Perlakuan bakteri endofit terhadap nematoda parasit menyebabkan nematoda mengalami kematian pada pengamatan 2 jam setelah perlakuan dan terus meningkat 6 dan 12 jam setelah perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa

perlakuan dengan isolat bakteri endofit dengan penambahan waktu memberikan pengaruh terhadap peningkatan mortalitas nematoda dibandingkan dengan kontrol. Pada perlakuan 2 jam isolat dengan kode EB45 dan EB49 memiliki mortalitas tertinggi sebesar 25.54% dan 17.06%, sedangkan pada perlakuan 6 jam isolat dengan kode EB13, dan EB45 merupakan isolat yang memiliki tingkat kematian nematoda parasit paling tinggi dengan jumlah 41.31% dan 39.55%, dan pada perlakuan 12 jam isolat dengan kode EB13, EB28, EB45, EB48 dan EB49 merupakan isolat dengan jumlah nematoda yang mengalami mortalitas terbanyak dengan persentase berturut-turut 47.71%, 49.45%, 53.74%, 51.41% dan 47.69%.

Juvenil nematoda yang mengalami inaktif diduga terjadi karena adanya pengaruh senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri dan bersifat toksik terhadap nematoda parasit. Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri endofit diantaranya yaitu pelarut fosfat dan enzim

penghidrolisa seperti kitinase, protease, selulase, lipase, dan pektinase (Berg dan Hallmann 2006). Hartini (2004) melaporkan bahwa perlakuan kultur filtrat bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman tomat mampu meningkatkan jumlah larva *Meloidogyne* spp. yang mengalami inaktif hingga 100%. Selain itu, perlakuan filtrat isolat bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman lada ada yang berpengaruh terhadap mortalitas larva nematoda hingga 86.3% (Munif dan Harni 2011).

KESIMPULAN

Empat spesies *Meloidogyne* yang teridentifikasi berdasarkan karakter pola perineal yaitu *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, dan *M. hapla*. Sebanyak 11 isolat dengan kode isolat EA32, EA40, EB3, EB4, EB13, EB28, EB30, EB36, EB45, EB48, EB49 berhasil diisolasi dari tanaman kenikir yang digunakan untuk pengujian *in vitro*, 11 isolat ini merupakan isolat yang negatif uji hipersensitif dan uji aktivitas hemolisis. Isolat dengan kode EB13, EB28, EB45, EB48 dan EB49 merupakan isolat dengan jumlah mortalitas nematoda terbanyak dengan persentase berturut-turut 47.71%, 49.45%, 53.74%, 51.41% dan 47.69% pada 12 jam setelah perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Barker, K. R. & Koening, S. R (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annu Rev Phytopathol*, 36, 165-205.
- Berg, G. & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. Di dalam: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editor. *Microbial Root Endophytes*. Verlag Berlin Heidelberg (DE): Springer. hlm 53-66.
- Caveness, F. E., & Jensen, H. J. (1955). Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proc Helminthol Soc Wash*, 25, 87-89.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol*, 104, 1675-1684.
- Dropkin, V. H. (1991). *Pengantar Nematologi Tumbuhan*. Ed ke-2. Supratoyo, penerjemah. Yogyakarta (ID): Gajah Mada University Press. Terjemahan dari: *Introduction to Plant Nematology*.
- Eisenback, J. D., Hirschman, H., Sasser, J. N., & Triantaphyllou, A. C. (1981). A Guide to The Four Most common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species) With a Pictorial Key. Washington DC (US): Cooperative Publication
- Departement of Plant Pathology and U.S Agency International Development.
- Goodey, T. (1973). Two methods for staining nematodes in plant tissue. *J Helminthol*.15: 137-144.
- Hallmann, J., Hallmann, A.Q., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*, 43, 895-914.
- Hartini, A. (2004). Isolasi bakteri endofit dan pengujian potensinya untuk mengendalikan nematoda *Meloidogyne* sp. pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [skripsi]. Bogor (ID): Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Hertle, R., Hilger, M., Weingardt-Kocher, S., & Walev, I. (1999). Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67(2),817-825.
- Hutagalung, L. (1988). Teknik Ekstraksi dan Membuat Preparat Nematoda Parasit Tumbuhan. Jakarta (ID): Rajawali Press.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E.A. (1982). *Microbiology for Medicine*. 14th ed. Los Altos. California : Lange Medical Publications.
- Jayasinghe, U. (2002). Potato seed in Indonesia: a baseline survey. Di dalam: Fuglie KO, editor. *Progress in Potato and Sweetpotato research inIndonesia.Proccedings of the CIP-Indonesia Research Review Workshop*. Bogor: International Potato Center.
- Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B., & Wilfert, C. M. (1992). *Zinsser Microbiology*. 20th ed. California : Appleton and Lange.
- Kasahara, S. & Hemmi, S. (1995). *Medicinal Herb Index in Indonesia*, Ed ke-2. Jakarta (ID): Eisai Indonesia.
- Kurniawati, F., Supramana, & Adnan, M. A. (2017). Spesies *Meloidogyne* Penyebab Puru Akar pada Seledri di Pacet, Cianjur, Jawa Barat. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 13(1), 26-30. DOI: 10.14692/jfi.13.1.26–30.
- Lelliot, R. & Stead, E. (1987). *Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease ofPlants*. British: British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publ. Oxford london edinburgh
- Luc, M., Sikora, R. A., & Bridge, J. (2001). *Nematoda Parasit Tumbuhan di Pertanian Subtropik dan Tropik*. Ed ke-2. Supratoyo, penerjemah. Yogyakarta (ID): Gajah Mada University Press. Terjemahan dari:

Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.

- May, W. F. & Lyon, H. H. (1996). *Pictorial key to Genera of Plant Parasitic Nematodes*. Edisi ke-5. New York (US): Cornell University.
- Melakeberhan, H., Wang, & Wei. (2012). Suitability of celery cultivars to infection by populations of *Meloidogyne hapla*. *J. Nematol*, 14(5), 623-629.
- Mulyadi. (2009). *Nematologi Pertanian*. Yogyakarta (ID): Jurusan Hama dan Penyakit Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.
- Munif, A. & Harni, R. (2011). Keefektifan bakteri endofit untuk mengendalikan nematoda parasit *Meloidogyne incognita* pada tanaman lada. *Buletin Ristri*, 2(3), 279-419.
- Munif, A., Wiyono, S., & Suwarno. (2012). Isolasi Bakteri endofit asal tanaman padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan tanaman. *J Fitopatol Indones*, 8(3), 57-64.
- Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, and Chen Y. (2004). Activation of Syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* α -toxin and β -toxin. *J. Biol. Chem.*, 279(1), 251-258.
- Prasasti, W. D. (2012). *Strategi Pengendalian Penyakit Nematoda Puru Akar (Meloidogyne spp.) pada Tanaman Tomat (Solanum lycopersicum L.)*. Yogyakarta (ID): UGM Press.
- Rosya, A. & Winarto. (2013). Keragaman Komunitas Fitonematoda pada Sayuran Lahan Monokultur dan Polikultur di Sumatera Barat. *JFI*. 9(3), 71-76. doi: 10.14692/jfi.9.3.7.1.
- Whitehead, A. G. (1998). *Plant Nematode Control*. London: CAB International.
- Yang He, S. (1996). Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiol*. 112, 865-869.
- Zhu, W., MaGbanua, M. M., & White, F. F. (2000). Identification of two novel hrp-associated genes in the hrp gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*. 182(7):1844-1853. doi: 10.1128/JB.182.7.1844-1853.2000