

Pendahuluan

Bawang merah (*Allium ascalonicum*. L) merupakan komoditas unggulan nasional, sehingga berbagai program dan kegiatan dilakukan dalam rangka meningkatkan produksinya. Produktivitas bawang merah nasional tahun 2009 sebesar 9,28 ton/ha, tahun 2010 sebesar 9,57 ton/ha, dan tahun 2011 sebesar 9,54 ton/ha (BPS, 2012). Produktivitas bawang merah ini masih tergolong rendah, bila dibandingkan potensi produksi optimum bawang merah yang dapat menca-pai 16 ton/ha. Salah satu penyebab rendahnya produktivitas adalah serangan bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (*Xaa*) penyebab penyakit hawar daun bakteri (HDB), yang telah dilaporkan menyerang tanaman bawang merah di Indonesia (Habazar, dkk., 2007). Menurut Resti, dkk., (2007) penyakit HDB telah tersebar di daerah sentra produksi bawang merah di Sumatera Barat, dengan persentase serangan mencapai 100 % di Kabupaten Solok dan 39,62 % di Kabupaten Agam. Schwart and Gent (2006) menyatakan kehilangan hasil (termasuk ukuran dan kualitas umbi) bisa mencapai 100 %, bila kondisi lingkungan mendukung. Patogen *Xaa* ini dapat ditularkan melalui benih (*seedborne pathogen*). Selain menyerang bawang merah *Xaa* juga dapat menyerang bawang putih, bawang daun, dan bawang bombay (Roumagnac *et al.*, 200)

Penelitian yang intensif tentang pengendalian penyakit HDB baru dilaporkan di luar negeri, seperti pergiliran tanaman dengan tanaman bukan inang, varietas tahan (Paulraj dan O'Garro, 1993), benih sehat, sanitasi lahan, menghindari irigasi yang ber-

lebih. Pengendalian secara kimia menggunakan bakterisida seperti Champ DP, Cuprofix, Cuprofix MZ, Kocide 2000, Mankocide, Nordox, NuCop 50 WP dan Top Copwiths (Schwartz and Gent, 2006), induksi ketahanan menggunakan Acibenzolar-s-metil. Selanjutnya menggunakan agen hayati seperti bakteri *Pantoea aglo-merans* galur C9-1 (Actigard 50 WP) pada daerah semi arid efektif mengendalik-hawar daun bakteri pada ba-wang merah (Schwartz and Gent, 2006).

Di Indonesia informasi mengenai pengendalian penyakit ini masih terbatas, karena penyakit ini baru ditemukan. Penggunaan bakteri endofit sebagai agen hayati dalam menginduksi ketahanan tanaman perlu dikembangkan. Menurut Habazar, dkk., (2007), rhizobakteria (RB) dari kelompok rhizosfir, rhizoplan dan endofit mampu menekan perkembangan penyakit HDB dan meningkatkan pertumbuhan tanaman bawang merah di rumah kaca dan dilapangan. Hasil penapisan bakteri endofit akar kedelai secara *in panta* juga menunjukkan mampu mengendalik-an penyakit pustul bakteri pada kedelai (Habazar dkk., 2012).

Kemampuan agen hayati sering kali berbeda dalam menekan perkembangan patogen pada suatu daerah, yang disebabkan keadaan lingkungan yang sangat kompleks, sehingga tiap populasi yang berada pada daerah yang berbeda akan mengalami tekanan seleksi yang berbeda pula. Hal ini akan menyebabkan adanya keragaman antar populasi dalam spesies yang sama (*interspesifik variation*) karena populasi tersebut beradaptasi dengan lingkungannya. Dengan demikian suatu spesies yang sama

tetapi berada pada wilayah geografi dan lingkungan yang berbeda dapat memiliki kemampuan yang berbeda dalam menekan perkembangan patogen. Keragaman genetik dalam spesies yang sama dari wilayah atau lingkungan yang berbeda tersebut merupakan faktor yang penting dalam keberhasilan pengendalian hayati (Van den Bosch *et al.*, 1982).

Bakteri endofit berada dalam jaringan tanaman dan tidak menimbulkan gejala penyakit pada tanaman (Bandara *et al.*, 2006). Bakteri endofit dapat diisolasi dari bagian akar, batang, daun, bunga, dan kotiledon. Bakteri dapat masuk melalui proses perkecambahan biji, akar-akar sekunder stomata, atau melalui kerusakan yang terjadi pada daun. Di dalam tanaman bakteri endofit dapat terlokalisasi pada bagian dimana bakteri tersebut mulai masuk atau menyebar ke bagian tanaman lainnya. Di dalam jaringan tanaman bakteri berada diruang antar sel, atau dalam jaringan pembuluh (Zinniel *et al.*, 2002). Pengendalian penyakit tanaman dengan bakteri endofit merupakan salah satu alternatif pengendalian yang ramah lingkungan, berkesinambungan dan dapat diintegrasikan dalam program pengendalian hama terpadu.

Bakteri endofit dapat berperan sebagai agen biokontrol, menekan perkembangan patogen, beberapa jenis nematoda dan serangga melalui mekanisme langsung ataupun tidak langsung. Mekanisme langsung dengan cara menghasilkan senyawa antimikroba, (Wang *et al.*, 2010), siderophor dan enzim litik (Lugtenberg and Kamilova, 2009), berkompetisi dalam memperoleh zat besi, nutrisi dan ruang, serta

parasitisme. Secara tidak langsung melalui mekanisme induksi ketahanan sistemik pada tanaman inang. Induksi ketahanan dapat meningkatkan aktivitas gen ketahanan mekanik ataupun metabolit tanaman inang. Meningkatkan kekuatan dinding sel inang, perubahan fisiologis tanaman inang melalui sintesa senyawa fenolik, PR protein, enzim kitinase, peroksidase, fenil alanine lyase, polifenol oksidase, asam salisi-lat, asam jasmonat dan fitoaleksin (Compant *et al.*, 2005). Sebagai pemacu pertumbuhan tanaman bakteri endofit dapat membantu ketersediaan hara bagi inangnya melalui fiksasi nitrogen dan kemampuan melarutkan fosfat (Lugtenberg dan Kamilova, 2009), menyediakan unsur Fe melalui siderophor, dan menghasilkan fitohormon seperti IAA, giberelin dan sitokinin (Miller dan Berg, 2009).

Kolonisasi bakteri endofit dalam jaringan tanaman dapat meningkatkan akumulasi senyawa pertahanan tanaman. Bakteri endofit dapat mengaktivasi sistem pertahanan berupa PR-protein. Senyawa asam salisilat dan ethylen yang merupakan molekul signal untuk induksi ketahanan sistemik. Akumulasi senyawa fenol dalam sel pada tanaman anggur yang diintroduksi dengan *Bulkholderia* sp strain PsJN, menunjukkan adanya induksi ketahanan sistemik dan terdapatnya enzim degradasi dinding sel berupa enzim endoglucanase dan *endopolygalacturonase* menunjukkan adanya sistem pertahanan yang bersifat lokal pada sel tanaman anggur (*Vitis vinifera*. L) (Compant *et al.*, 2005).

Berdasarkan uraian diatas maka telah dilakukan penelitian yang berjudul Karakterisasi Respon Fisiologis Tanam-

an Bawang Merah yang di-introduksi dengan Bakteri Endofit Indigenus terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas axonopodis pv allii*).

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan bakteri endofit yang mampu mengendalikan penyakit HDB dan meningkatkan hasil bawang merah.
2. Mengkarakterisasi fisiologis dan identifikasi molekular bakteri endofit yang punya kemampuan mengendalikan penyakit HDB dan meningkatkan hasil bawang merah.
3. Mengetahui respon fisiologis tanaman bawang merah yang tahan penyakit HDB setelah diintroduksi dengan bakteri endofit terpilih.
4. Mengetahui bakteri endofit yang mampu meningkatkan produksi walaupun tanaman bawang merah terserang penyakit HDB

Bahan dan Metoda

Seleksi Isolat Bakteri endofit Indigenus Untuk Pengendalian Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Bawang Merah

Pengambilan sampel akar bawang merah

Sebagian besar tanaman bawang merah di Kab. Agam dan Solok terserang *Xaa*, kondisi lahan endemik per-tanaman bawang merah dapat dilihat pada gambar 3. Diantara tanaman yang bergejala HDB masih terdapat tanaman sehat, yang merupakan sumber bakteri endofit. Sampel yang diambil adalah akar tanaman bawang merah sehat dan dimasukkan ke dalam kantong plastik,

diberi label dan disimpan pada suhu 17-20° C.

Isolasi bakteri endofit

Bakteri endofit diisolasi dari jaringan akar dengan metoda pengenceran seri (Klement *et al*, 1990). Akar bawang merah dicuci dengan akuades steril dua kali. Sterilisasi permukaan menggunakan etanol 70 % selama 5 menit (3 kali), kemudian dicuci dengan akuades steril. Jaringan akar dihancurkan menggunakan lumpang dan mortar steril, dan diencerkan sampai 10^{-4} . Suspensi bakteri dari pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} dibiakkan dalam medium *Nutrient Agar* (NA), dan diinkubasi 48 jam pada suhu ruangan. Koloni tunggal dengan ciri morfologi yang berbeda diambil dan ditumbuhkan pada medium yang sama, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.

Semua isolat dikarakterisasi secara morfologi (warna, bentuk koloni, dan permukaan koloni), fisiologi (reaksi Gram), dan patogenisitas (reaksi hipersensitif).

Isolasi *Xaa*

Sumber inokulum diperoleh dari daun bawang merah yang menunjukkan gejala penyakit HDB, di lahan endemik di Sungai Nanam, Alahan Panjang Kec. Lembah Gumanti Kab. Solok. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran seri (Klement *et al*, 1990). Daun yang bergejala disterilkan permukaannya dengan dengan etanol 70%. Suspensi bakteri diencerkan sampai 10^{-6} , suspensi pada pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} dipindahkan 0,1 ml ke dalam cawan *Petri* kaca yang berisi medium NGA

(*Nutrien Glucosa Agar*), diratakan dengan spatula, diinkubasi 5x24 jam.

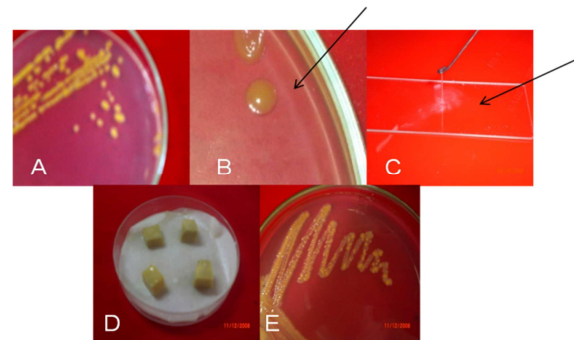
Identifikasi *Xaa*

Morfologi koloni *Xaa* diamati pada medium NGA setelah inkubasi 5 x 24 jam (gambar 1.a), Morfologi koloni yang diamati yaitu warna koloni, permukaan koloni, dan bentuk koloni. Koloni *Xaa* berbentuk bulat, berwarna kuning, cembung dan berlendir (gambar 1 b)

Uji Gram bertujuan untuk mengetahui apakah isolat bakteri bersifat Gram negatif atau positif. Pengujian menggunakan larutan KOH 3%. (Klement *et al*, 1990). Bakteri *Xaa* bersifat Gram negatif (Gambar 1 c)

Uji Pigmen Xanthomonadin bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan pigmen Xanthomonadin. Biakan murni dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi medium NGA (*Nutrient Glukosa Agar*) dengan metode gores dan diinkubasi selama 5 x 24 jam (Schaad, 1998). Koloni *Xaa* menghasilkan pigmen xanthomonadin (Gambar 1 d)

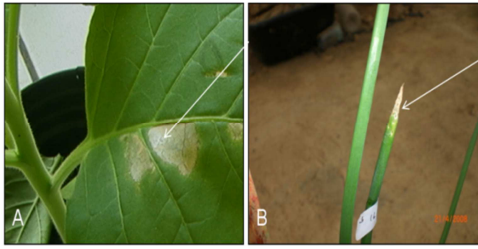
Uji pektinase bertujuan untuk mengetahui apakah isolat yang diuji memproduksi enzim pektinase. Potongan umbi kentang disterilisasi permukaannya dengan etanol 70%, diletakkan dalam cawan petri yang telah dilapisi kertas saring lembab dan diinokulasi dengan 1 ml suspensi bakteri (10^6 sel/ml) (Schaad, 1988). Bakteri *Xaa* memproduksi enzim pektinase (Gambar 1e)



Gambar 1 : Ciri *Xaa* isolat *Xaa* Sn1, (A) Bentuk koloni (B) koloni tunggal pada media NGA (5 hari setelah inkubasi, hsi), (C) Gram Negatif, (D) Pigmen xanthomona-din pada media NGA, (E) menghasilkan enzim pektinase pada umbi kentang

Uji RH menggunakan suspensi bakteri *Xaa* (10^8 sel/ml) diinfiltrasikan pada permukaan bawah daun tembakau menggunakan jarum suntik dan diinkubasi selama 2x24 jam. Bila terjadi nekrotik dalam waktu 2x24 jam artinya bakteri bersifat HR positif (Klemen *et al*, 1990). Daun tembakau yang diinfiltrasi dengan isolat *Xaa* menunjukkan reaksi hipersensitif berupa gejala nekrotik (Gambar 2 a)

Uji patogenisitas dengan cara melukai bagian ujung daun tanaman bawang merah yang berumur 15 hari setelah tanam (hst) dengan jarum steril, kemudian dioleskan suspensi *Xaa* (10^6 sel/ml). Daun yang diperlakukan diselubungi dengan plastik bening kemudian diinkubasi 7 x 24 jam (Hamzah, 1993). Daun bawang merah yang diinokulasi dengan isolat *Xaa* menunjukkan gejala water soaking kemudian nekrotis (Gambar 2 b)



Gambar 2: Reaksi Hipersensitif dan patogenisitas isolat Xaa (A) Gejala nekrotik pada daun tembakau yang diinfiltrasi dengan Xaa (2 x 24 jam setelah infiltrasi) (B) Gejala nekrotik pada daun bawang merah yang diinokulasi dengan Xaa (7 hari setelah inokulasi)

Seleksi isolat bakteri endofit indigenus dalam menginduksi ketahanan bawang merah terhadap HDB

Seleksi dilakukan secara *in planta* di rumah kawat, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) %. Perlakuannya adalah introduksi 82 isolat bakteri endofit pada bibit bawang merah, dengan 3 ulangan. Data dianalisis dengan sidik ragam bila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (DNMRT) pada taraf nyata 5 %.

Penanaman bawang merah

Media tanam yang digunakan merupakan tanah dan pupuk kandang sebagai pupuk dasar (3:1 v/v), yang disterilkan secara Tyndalisasi.

Introduksi Isolat Endofit dan Penanaman

Benih bawang merah yang digunakan adalah Kultivar Medan (rentan terhadap HDB). Benih diperoleh dari petani penangkar benih di Nagari Alahan Panjang Kab. Solok. Benih tersebut berkualitas baik yaitu: bernas, berukuran sedang dan seragam (diameter 1,5- 2 cm atau berat 2,5 – 5 g), berwarna cerah, utuh, tidak cacat dan tidak bergejala penyakit (AAK, 1998).

Sebelum ditanam benih dipotong 1/3 bagian atas kemudian di-rendam dalam suspensi bakteri endofit selama 15 menit, selanjutnya dikering anginkan, dan ditanam. Pada tiap *poly-bag*, ditanam 2 benih dengan cara membenamkan benih dalam tanah sedalam 2-3 cm dan ditimbun dengan selapis tanah. Untuk kontrol benih direndam dengan *aquades* steril.

Inokulasi Xaa

Setelah tanaman berumur 14 hari diinokulasi dengan Xaa, dengan cara melukai bagian ujung daun bawang dengan jarum steril, kemudian suspensi Xaa dioleskan pada bagian yang dilukai dan tanaman disungkup dengan plastik bening. Inkubasi selama 7 hari dan tiap hari diamati gejala yang muncul.

Pemeliharaan

Pemeliharaan meliputi pemupukan dengan menggunakan pupuk buatan, penyiangan gulma dan pengendalian hama. Pengendalian gulma dan pengendalian hama dengan cara mekanik. Pupuk buatan yang diberikan adalah pupuk Urea 2 gr/polybag setara dengan 500 Kg/ha, pupuk SP₃₆ 1,2 gr/polybag setara dengan 300 Kg/ha,

dan pupuk KCL 0,8 gr/polybag setara dengan 200 Kg/ha. Pupuk diberikan pada saat tanaman berumur 17 hst (hari setelah tanam) dengan dosis ½ bagian Urea, satu bagian SP36 dan satu bagian KCL. Saat tanaman berumur 36 hst diberikan pupuk dengan dosis ½ bagian Urea, yang merupakan sisa pemupukan sebelumnya (AAK, 1998). Penyiangan dilakukan bersamaan dengan pemupukan yaitu saat tanaman berumur 2-3 minggu dan saat tanaman berumur 4-5 minggu. Penyiraman dilakukan setiap hari, pengendalian hama dilakukan secara mekanik.

Panen

Kriteria panen adalah tanaman telah berumur 70 -80 hst, daun sudah mulai layu, pangkal batang mengeras, dan sebagian umbi telah tersembul diatas tanah (AAK, 1998).

Pengamatan

solasi bakteri endofit indigenus dari akar tanaman bawang merah di lahan endemik HDB

Keragaman bakteri endofit

Bakteri yang tumbuh dihitung keragamannya berdasarkan morfologinya yaitu dari bentuk koloni, warna koloni, pinggiran koloni, permukaan dan diameter koloni.. Karakter fisiologis bakteri endofit diamati reaksi Gram dan Reaksi Hipersensitif.

Seleksi isolat bakteri endofit indigenus dalam menginduksi ketahanan bawang

Insidensi Penyakit (%)

Pengamatan dari mulai munculnya gejala awal sampai panen, dengan interval waktu tiga hari. Penghitungan insidensi daun terserang menggunakan rumus;

$$P = \frac{X}{Y} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

P= Insidensi daun terserang

X= Jumlah daun tanaman yang terserang

Y= Jumlah daun yang diamati

Persentase penekanan insidensi penyakit dengan penggunaan isolat bakteri endofit menggunakan rumus

$$E = \frac{K - P}{K} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan:

E = Persentase penekanan

K = Kontrol

P = Perlakuan

Severitas penyakit (%)

Pengamatan intensitas penyakit dimulai setelah munculnya gejala pertama sampai panen dengan interval 3 hari. Penghitungan menggunakan rumus Mc. Kenney:

$$I = \frac{\sum (n_1 \times v_1)}{Z \times N} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

I = Severitas penyakit

N1= Jumlah daun dari tiap skala serangan

V1= Nilai skala dari tiap skala serangan

N = Jumlah daun yang diamati

Z = Nilai skala serangan tertinggi

Nilai skala yang dipakai adalah sebagai berikut

Tabel .1: Skala serangan penyakit hawar daun bakteri pada daun bawang

Skala	Tingkat serangan	Kerusakan	Reaksi Ketahanan
0	Tidak bergejala	0 %	Imun
1	Gejala hawar sangat ringan	>0 – 10 %	Tahan
2	Gejala hawar ringan	>10 – 20 %	Agak tahan
3	Gejala hawar sedang	>20 – 30 %	Agak rentan
4	Gejala hawar berat	>30 – 50 %	Rentan
5	Gejala hawar berat sekali	>50 %	Sangat rentan

Sumber : Habazar *et al.* dimodifikasi (2007)

Efektivitas penggunaan isolat bakteri endofit dalam menekan severitas daun terserang hawar daun bakteri menggunakan rumus (2).

Pertumbuhan dan hasil tanaman bawang merah

Pengamatan pertumbuhan dengan mengukur tinggi tanaman, jumlah daun, berat basah dan berat kering umbi. Pengamatan dimulai saat muncul tunas sampai panen dengan interval waktu tiga hari. Penghitungan berat basah dan berat kering umbi, setelah panen (umur 70 hari).

Efektivitas penggunaan isolat bakteri endofit dalam meningkatkan pertumbuhan dan hasil bawang merah menggunakan rumus

$$E = \frac{P - K}{P} \times 100 \% \dots\dots(4)$$

Keterangan:

K = Kontrol

P = Perlakuan

Karakterisasi Fisiologis Dan Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Indigenus Terpilih dalam mengendalikan Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Bawang Merah

Karakterisasi fisiologis bakteri endofit indigenus terpilih dalam mengendalikan penyakit HDB pada bawang merah

Produksi Asam Salisilat

Kemampuan isolat bakteri endofit indigenus terpilih dalam menghasilkan asam salisilat dianalisis menggunakan metoda Elektroforesis Kapiler (*capillary electrophoresis*) (Gambar 9). Elektroforesis kapiler di aplikasikan pada tegangan 10 KV, panjang gelombang yang digunakan 210 nm, dan suhu 20°C (Putra, 2010, komunikasi pribadi). Isolat bakteri endofit dibiakkan dalam media cair Nutrien Broth (NB) dan diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 250 rpm selama 48 jam pada temperatur ruang. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 7000 g selama 10 menit. Supernatan dianalisis dengan Elektroforesis kapiler menggunakan asam salisilat murni sebagai standar.

Produksi Antibiotik

Isolat bakteri endofit indigenus terpilih dibiakkan dalam medium Nutrien Broth (NB) diinkubasi pada shaker selama 2 x 24 jam, kecepatan 200 rpm pada suhu ruang. Biakan bakteri tersebut disentrifus dengan kecepatan 7000 g selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dari pellet. Kertas saring

steril diameter 0,5 cm direndamkan dalam supernatan selama 5 menit, kemudian dikering anginkan. Kertas saring disusun pada medium *Potato Dextrosa Agar (PDA)* yang telah diinokulasi bakteri *Xaa* dan diinkubasi selama 2 x 24 jam (Nasrun, 2005)

Kolonisasi jaringan akar bawang merah

Kolonisasi perakaran tanaman bawang merah dengan bakteri endofit menggunakan mutan isolat bakteri endofit yang resisten terhadap Rifampisin. Mutan diperoleh dengan cara menumbuhkan isolat bakteri endofit pada medium NA yang telah ditambahkan antibiotik Rifampisin dengan konsentrasi yang terus ditingkatkan dari 10, 20, 50, sampai 110 ppm. Mutan endofit ini selanjutnya di biakkan dalam medium *Nutrien Broth (NB)* (Habazar *et al*, 2007)

Kolonisasi jaringan akar bawang merah ditentukan dengan cara introduksi mutan bakteri endofit indigenus terpilih pada benih bawang merah kultivar medan. Kemampuan kolonisasi endofit pada jaringan akar diamati dengan melakukan reisolasi bakteri dari akar tanaman yang ditanam pada tanah steril. Suspensi bakteri hasil isolasi ditumbuhkan pada medium NA yang telah ditambahkan antibiotik Rifampisin dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan antibiotik pada saat pembuatan mutan. Isolat bakteri yang mampu tumbuh merupakan mutan isolat bakteri endofit yang diintroduksi pada benih sebelumnya (Nasrun, 2005).

Karakterisasi fisiologis bakteri endofit indigenus terpilih dalam memacu pertumbuhan tanaman

Produksi IAA

Pengujian menggunakan metoda kalorimeter Bric *et al* (1991). Bakteri dikulturkan dalam medium cair Kings B dan diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 2 x 24 jam. Kultur disentrifus pada 7000 g selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dari pelletnya, 2 ml supernatan ditambahkan dalam 4 ml reagent sowlkesky (1 ml FeCl_3 dalam 49 ml perchloric acid 35 %) dihomogenkan, inkubasi selama 20 menit dan absorbannya ditentukan dengan *spectrofotometri* panjang gelombang 530 nm.

Produksi pelarut fosfat

Enam isolat endofit indigenus terpilih dibiakkan pada medium selektif Pikovskaya (5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$, NaCl 0.2 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, Glukosa 10 g, Ekstrak ragi 0.5 g, agar 15 g, aquades 1000 ml) (Premono, 1995), Isolat dibiakkan dengan metode gores pada medium pikovskaya dan diinkubasi selama 48 jam. Isolat yang mampu melarutkan fosfat ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri.

Identifikasi molekular Bakteri endofit indigenus terpilih

Identifikasi dilakukan terhadap enam isolat bakteri endofit indigenus terpilih yang potensial untuk mengendalikan penyakit HDB pada bawang

merah. Isolasi dan pemurnian DNA bakteri endofit dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)*. DNA hasil isolasi selanjutnya diamplifikasi menggunakan pasangan primer 27F(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG'3) dan primer 42R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') Kondisi awal PCR diatur pada suhu 94 °C selama 5 menit, selanjutnya diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55 °C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 2 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis menggunakan gel agarose 1 % dalam buffer Tris Boric EDTA (TBE 0.5 x) dan divisualisasi dibawah UV transilluminator. Hasil amplifikasi DNA menghasilkan pita berukuran ± 1300 bp.

Produk PCR yang diperoleh selanjutnya disekuensing di PT Eijmen Indonesia Jakarta. Kegiatan sekuensing menggunakan prinsip kerja Sanger *et al* (1997). Sekuensing dilakukan secara ore read direction (satu arah) menggunakan salah satu primer yang dipergunakan pada proses amplifikasi. Keenam isolat endofit terpilih di-sekuensing dengan primer 27 F dan 42 R. Data hasil sekuensing dicocokkan dengan data *Gene Bank NCBI* menggunakan *BLAST* pada <http://www.ncbi.nlm.nih.org>.

Pengamatan

Karakterisasi fisiologis bakteri endofit indigenus terpilih dalam mengendalikan penyakit HDB pada bawang merah

Produksi Asam salisilat

Pengamatan hasil analisis asam salisilat dengan membandingkan puncak elektroforegram larutan standar asam salisilat dengan larutan supernatant isolat endofit terpilih. Konsentrasi asam salisilat yang dihasilkan dikalibrasikan menggunakan kurva asam salisilat standar (0-50 ppm/ml).

Produksi Antibiotik

Kemampuan menghasilkan antibiotik ditandai dengan adanya zona hambatan disekeliling kertas cakram. Untuk menentukan perbedaan kemampuan menghasilkan antibiotik dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terbentuk.

Kolonisasi jaringan akar

Pengamatan menggunakan tanaman yang dibuat seri, interval pengamatan 7 hari dan pengamatan dilakukan sebanyak 5 kali (sampai umur tanaman 35 hari). Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran seri. Penghitungan populasi bakteri endofit indigenus terpilih menggunakan rumus Klement *et al* (1990) sebagai berikut:

$$JP = A \times B$$

Keterangan :

JP = Jumlah populasi bakteri (cfu/ml)

A = Jumlah koloni bakteri

B = Faktor pengenceran

Karakterisasi fisiologis isolat bakteri endofit indigenus terpilih dalam memacu pertumbuhan tanaman

Produksi IAA

Kemampuan menghasilkan IAA ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna larutan supernatan yang telah dicampur dengan reagen sowlkesky menjadi merah. Absorbannya ditentukan dengan *spectrofotometri* panjang gelombang 530 nm. Konsentrasi IAA yang dihasilkan dikalibrasikan menggunakan kurva IAA standar (10-100 ppm/ml).

Produksi Pelarut Fosfat

Isolat yang mampu melarutkan fosfat ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri. Indeks kearutan fosfat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$I = A/B$$

Keterangan:

- I : Indeks kelarutan fosfat
- A : Diameter (koloni + zona bening)
- B : Diameter koloni bakteri (Premono, 1995)

Menurut Silva dan Vidor (2000), kemampuan melarutkan fosfat berdasarkan nilai indeks kelarutan fosfat dapat dikelompokkan ; Rendah bila : $I < 2$, Sedang bila : $2 < I < 3$, dan tinggi bila : $I > 3$

Identifikasi molekular bakteri endofit indigenus terpilih

Keenam isolat endofit terpilih disekuensing dengan primer 27 F dan 42 R. Data hasil sekuensing dicocokkan dengan data *Gene Bank NCBI* menggunakan *BLAST* pada <http://www.ncbi.nlm.nih.org>.

Karakterisasi Respon Fisiologis Tanaman Bawang Merah yang Diintroduksi dengan Bakteri Endofit Indigenus Terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri

Kemampuan Tanaman Bawang Merah Terinduksi Menghasilkan Enzim Pertahanan

Media tanam

Media tanam yang digunakan merupakan tanah dan pupuk kandang sebagai pupuk dasar (3:1 v/v) , yang disterilkan secara Tyndalisasi.

Introduksi Isolat Endofit dan Penanaman

Sebelum ditanam benih dipotong 1/3 bagian atas kemudian direndam dalam suspensi bakteri endofit (10^8 sel/ml) selama 15 menit, dikering anginkan, dan ditanam. Untuk kontrol benih direndam dengan *aquades* steril

Inokulasi patogen

Setelah tanaman berumur 14 hari dilakukan inokulasi dengan pa-togen *Xaa*, (10^6 sel/ml). Inokulasi dengan melukai permukaan daun dengan jarum steril, kemudian dioleskan suspensi *Xaa* dan tanaman disungkup dengan plastik

bening. Tanaman di-inkubasi selama 7 hari dan tiap hari diamati gejala yang muncul.

Pengambilan sampel untuk aktivitas enzim

Setelah inokulasi dilakukan pengambilan sampel untuk 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30 hari setelah inokulasi (hsi). Sampel yang diambil adalah bagian daun dan akar bawang merah. Sampel dimasukkan dalam plastik terpisah dan diberi label.

Ekstraksi enzim

Ekstraksi enzim dengan metode Kanazawa, Eguchi, Iwara dan Oetomo (1981) dan fenilalaninilase menggunakan metode Dickerson, Pascholati, Hageman dan Nicholson (1984); Gout, Sharma dan Furuya (1991); Ralton, Hawlet, Clarke, Irwin dan Imrie (1988); dan Saunders dan Mc. Clure, (1975).

Enzim peroksidase (PO) dan polifenol oksidase (PPO)

Sampel daun segar ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dihancurkan dengan mortar setelah ditambahkan segera 2,5ml 0,5% buffer kalium posfat pH 7 dan 0,1 gram PVP. Campuran tersebut diambil ekstraknya dan disaring dengan dua lapis kain kasa, disentrifus dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan tersebut dipakai untuk pengukuran aktivitas peroksidase dan polifenol oksidase.

Enzim fenilalanin ammonia lyase (PAL)

Sampel bagian tanaman yang segar ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dihancurkan dengan mortal lalu ditambahkan 2,5 ml buffer borat (pH 8,8) yang mengandung 54 mM mercaptoetanol dan 1 gram PVP. Supernatan jaringan disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 25 menit pada suhu 4°C untuk selanjutnya digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim PAL.

Kemampuan Tanaman Bawang Merah Terinduksi menghasilkan Asam salisilat

Persiapan tanaman

Sama seperti persiapan untuk pengujian enzim pertahanan, benih bawang merah varietas medan diintroduksi dengan 6 isolat endofit indigenus terpilih dan ditanam pada media tanah steril. Sebagai pembanding ditanam juga tanaman kontrol (-) yang tidak diintroduksi bakteri endofit tapi diinokulasi dengan *Xaa*, dan kontrol (+) yang tidak diintroduksi bakteri endofit dan tidak diinokulasi patogen *Xaa*. Tanaman dipelihara selama dua minggu di rumah kawat. Setelah dua minggu tanaman diinokulasi dengan *Xaa* menggunakan metode pelukaan daun.

Pengambilan sampel untuk analisa asam salisilat

Pengambilan sampel dilakukan pada saat gejala telah muncul pada satu tanaman perlakuan, bagian tanaman yang dipanen adalah daun dan akar tanaman. Selanjutnya daun dan akar

dibersihkan dengan air dan dikoleksi. Satu gram akar atau daun diekstraksi menggunakan 10 ml methanol dan digerus pada lumping perselen steril. Hasil ekstraksi disentrifus dengan kecepatan 6000 g selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan selanjutnya di analisis menggunakan elektroforesis kapiler dengan asam salisilat standar sebagai pembanding.

Analisis asam salisilat

Elektroforesis kapiler (Agilent 7100) di aplikasikan pada tegangan 10 KV. 100 μ l, panjang gelombang yang digunakan 210 nm, dan suhu 20°C. Supernatant dari akar atau daun diinjeksikan pada elektroforesis kapiler dan dibandingkan dengan injeksi asam salisilat murni. Untuk menentukan konsentrasi asam salisilat yang dihasilkan menggunakan kurva kalibrasi asam salisilat standar.

Pengamatan

.Kemampuan Tanaman Bawang Merah Terinduksi Menghasilkan Enzim Pertahanan

Pengamatan terhadap aktivitas enzim ketahanan terhadap *Xaa* pada tanaman bawang yang telah diinduksi dengan bakteri endofit terpilih. Aktivitas enzim ketahanan yang diamati yaitu aktivitas enzim periksidase, polifenol oksidase dan phenilalanin amonia lyase (PAL). Analisis enzim dihitung berdasarkan perubahan absorban persatuan waktu pergram jaringan. Aktivitas enzim ketahanan diukur dengan menggunakan rumus :

$$AE = \frac{A}{T} / \text{gram jaringan}$$

Keterangan:

AE = aktivitas enzim

A = Selisih absorban

T = selisih waktu

Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

Kemampuan Tanaman bawang merah terinduksi menghasilkan asam salisilat

Pengamatan hasil analisis asam salisilat dengan membandingkan puncak elektroforegram larutan standar asam salisilat dengan larutan supernatant hasil ekstraksi daun atau akar bawang merah. Konsentrasi asam salisilat yang dihasilkan dikalibrasikan menggunakan kurva asam salisilat standar (0-50 μ g/ml

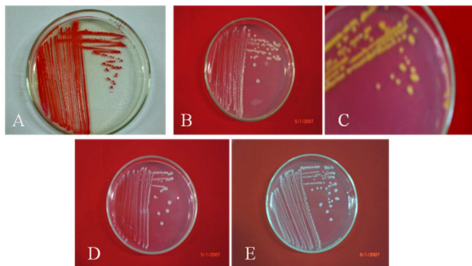
Hasil

Seleksi Isolat Bakteri endofit Indigenus Untuk Pengendalian Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Bawang Merah

Keragaman bakteri endofit indigenus dari akar tanaman bawang merah di lahan endemik HDB

Isolasi sampel jaringan akar bawang merah sehat dari daerah endemik HDB di Kab Solok dan Kab. Agam, diperoleh 82 isolat bakteri endo-fit, yang terdiri dari 62 isolat (75,61 %) dari Kab. Solok dan 20 isolat (24,39%) dari Kab. Agam. Pada Kab. Solok dari 30 sampel tanaman diperoleh 62 isolat endofit (rata-rata dari satu sampel diperoleh 2.06 isolat), pada Kab. Agam dari 11 sampel diperoleh 20 isolat endofit (rata-

rata dari satu sampel diperoleh 1.8 isolat). Karakter mor-fologi dan fisiologi isolat tersebut be-ragam (gambar 3), dapat dibagi menjadi 6 kelompok besar yaitu; 1) bentuk koloni bulat, datar, tidak berlendir, berwarna putih keruh, (44 isolat), 2) bentuk koloni *irregular* datar, tidak berlendir, berwarna putih keruh (10 isolat), 3) bentuk koloni Bulat, cembung, berlendir, berwarna kuning (10 isolat), 4) bentuk koloni bulat, cembung, berlendir, berwarna putih (8 isolat), 5) bentuk koloni bulat, cembung, berlendir, berwarna merah (8 Isolat), 6) koloni berbentuk benang-benang (2 isolat). Isolat – isolat dari Kab. Solok jumlahnya lebih banyak dan morfologinya lebih beragam dibandingkan Kab. Agam. Berdasarkan reaksi Gram yang dominan adalah Gram positif yaitu 56 isolat (68.29 %) sedangkan Gram negatif 26 isolat (31.71 %).



Gambar 3:. Bentuk koloni beberapa isolat bakteri endofit dari jaringan akar bawang merah (A) *S.marcescens* dari Kab. Solok (B) *Bacillus* sp. SJI, dari Kab. Solok, (C) BD2.1E1 dari Kab. Agam, (D) PU2E1 dari Kab. Solok, (E) *B.cereus* P14 dari Kab. Agam

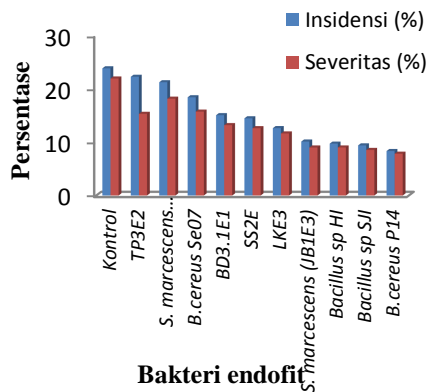
Seleksi isolat bakteri endofit indigenus dalam menginduksi

ketahanan bawang merah terhadap HDB

Insidensi dan severitas penyakit HDB

Insidensi dan severitas penyakit HDB pada bawang merah yang di-introduksi dengan 10 isolat bakteri endofit indigenus berbeda nyata menurut DNMRT taraf nyata 5 % (Gambar 3). Empat isolat terbaik dalam penekanan insidensi penyakit HDB yaitu, isolat BD4.2E1 insidensinya 8.33 % (penekanan insidensi 65.06 %), isolat PU2E2 insidensinya 9.39 % (penekanan insidensi 60.61 %), isolat SN1E4 insidensinya 9.72% (penekanan insidensi 59.23 %), isolat JB1E3 insidensinya 10.11 % (penekanan insidensi 57.59 %).

Severitas penyakit HDB pada isolat BD4.2E1 7.83 % (penekanan severitas 64.30 %), isolat PU2E2 severitasnya 8.54 % (penekanan severitas 61.06 %), isolat SN1E4 severitasnya 9.00 % (penekanan severitas 58.96 %), isolat JB1E3 severitasnya 8.99 % (penekanan severitas 59.01 %). Introduksi isolat bakteri endofit mampu menurunkan insidensi, severitas dan meningkatkan ketahanan tanaman. 8 isolat memiliki reaksi tahan (PK2E4, PK2E3, BD4.2E1, PU2E2, SN1E4, LL1E3, ULG1E4 dan JB1E3).

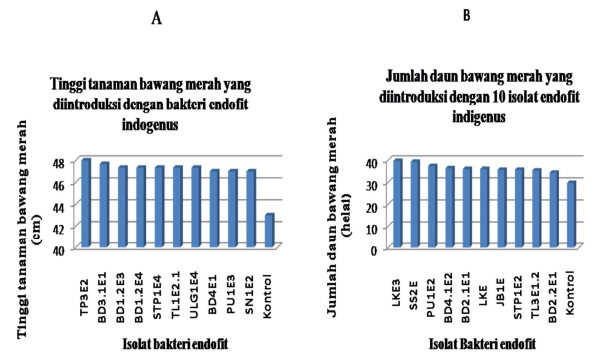


Gambar 3. Insidensi dan severitas penyakit HDB pada tanaman bawang merah yang diintroduksi dengan 10 isolat bakteri endofit indigenus (60 hst)

Pertumbuhan Bawang Merah

Jumlah daun dan tinggi tanaman bawang merah yang diintroduksi isolat bakteri endofit indigenus ditampilkan pada Gambar 4. Jumlah daun dan tinggi tanaman bawang merah yang diintroduksi dengan isolat bakteri endofit berbeda nyata menurut DNMRT taraf nyata 5 %. Isolat LKE3 merupakan isolat dengan jumlah daun terbanyak (39.67 helai) berbeda nyata dengan isolat lainnya. Berikutnya isolat SS2E dengan jumlah daun 39.33 helai dan isolat PU1E2 dengan jumlah daun 37.33 helai. Efektivitas peningkatan jumlah daun dibandingkan kontrol pada isolat LKE3 33.70 %, diikuti isolat SS2E 32.56 % dan isolat PU1E2 25.82 %. Isolat TP3E2 merupakan isolat dengan tinggi tanaman terbaik (48.00 cm), diikuti isolat BD3.1E1 dengan tinggi 47.67 cm dan isolat BD1.2E3 dengan tinggi 47.33 cm. Isolat-isolat ini berbeda nyata dengan kontrol dan isolat lainnya menurut DNMRT 5 %. Efektivitas

peningkatan tinggi tanaman bawang merah terbaik dibandingkan kontrol pada isolat TP3E2 sebesar 11.63 % diikuti isolat BD3.1E1 10.86 % dan BD1.2E3 10.07 % .

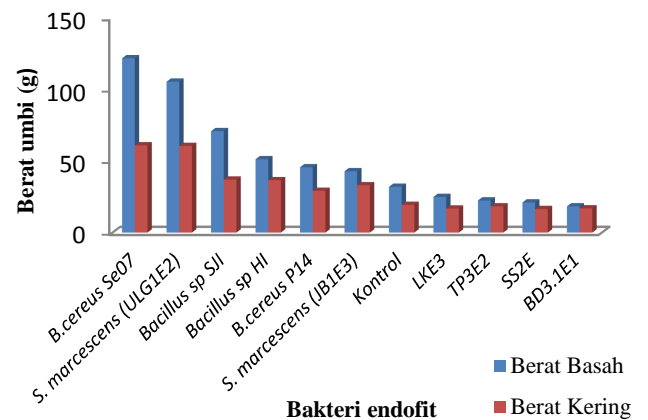


Hasil Bawang merah

Berat basah dan berat kering umbi bawang merah yang diintroduksi dengan isolat bakteri endofit indigenus ditampilkan pada Gambar 5. Berat basah dan berat kering umbi bawang merah berbeda nyata dengan kontrol dan antara isolat lainnya menurut DNMRT taraf nyata 5 %. Isolat bakteri endofit dengan berat basah dan berat kering umbi yang tertinggi adalah isolat SN2E2 dengan berat basah 121.98 g (peningkatan 281.66%), berat kering 60.86 g (peningkatan 214.85%) dibandingkan kontrol. Isolat ULG1E2 dengan berat basah 105.77 g (peningkatan 230.94 %) berat kering 60,46 g (peningkatan 212.78%). Empat isolat yang mampu menekan persentase dan intensitas penyakit HDB juga mampu meningkatkan berat basah dan berat kering umbi. Bawang merah yang diintroduksi dengan isolat bakteri endofit PU2E2 menghasilkan umbi dengan berat basah 70.79 g (peningkatan 121.50 %) berat kering 36.98 g (peningkatan 91.31 %); isolat SN1E4 berat basah 51.16 g

(peningkatan 60.08 %) berat kering 36.55 g (peningkatan 89.08 %), isolat BD4.2E1 berat basah 45.59 g (peningkatan 42.65 %) berat kering 29.12 g (peningkatan 50.65 %), dan isolat JB1E3 berat basah 42.78 g (peningkatan 33.85 %) berat kering 33.01 g (peningkatan 70.77 %). Tidak semua isolat mampu meningkatkan hasil bawang merah karena ada beberapa isolat yang hasilnya lebih rendah dari kontrol. Isolat tersebut tidak mampu meningkatkan berat basah dan berat kering umbi bila dibandingkan kontrol (lampiran 4).

Penelitian ini menunjukkan hasil yang lebih baik, karena ada dua isolat (isolat ULG1E2 dan SN2E2) dengan persentase peningkatan hasilnya lebih dari 200%. Peningkatan hasil lebih dari 200 % menunjukkan walaupun tanaman bergejala HDB namun tetap dapat berproduksi tinggi. Enam isolat terbaik dalam menekan penyakit dan meningkatkan hasil (SN2E2, ULG1E2, PU2E2, SN1E4, JB1E3 dan BD4.2E1), dapat berproduksi antara 15 – 7 ton/ha dan kemampuan ini lebih baik dari hasil optimum bawang kultivar medan (7.4 ton/ha).



Gambar 5. Berat basah dan berat kering bawang merah yang diintroduksi dengan isolat 10 isolat bakteri edofit indigenus (76 hst)

Berdasarkan persentase penanganan penyakit HDB (insidensi dan severitas), persentase peningkatan pertumbuhan (tinggi dan jumlah daun), persentase peningkatan hasil (berat basah dan berat kering umbi), dipilihlah isolat endofit indigenus terbaik untuk pengujian selanjutnya. Isolat yang dapat menekan penyakit dengan baik (BD4.2E1, PU2E2, SN1E4 dan JB1E3), isolat yang terbaik dalam pertumbuhan tanaman (LKE3, SS2E, TP3E2 dan BD3.1E1), isolat yang dapat meningkatkan hasil SN2E2 dan ULG1E2. Sehingga dipilihlah enam isolat yang dapat menekan penyakit HDB dan berproduksi dengan baik. Isolat tersebut adalah BD4.2E1, PU2E2, SN2E4, ULG1E2, SN2E2 dan JB1E3

Karakterisasi Fisiologis Dan Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Indigenus Terpilih Untuk Pengendalian Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Bawang Merah

Karakterisasi fisiologis bakteri endofit indigenus terpilih dalam mengendalikan penyakit HDB pada bawang merah

Produksi Asam Salisilat

Enam isolat bakteri endofit indigenus terpilih dianalisis kemampuannya menghasilkan asam salisilat dengan menggunakan elektroforesis kapiler. Hasil analisis ditampilkan pada Tabel 3,

Dua yaitu isolat JB1E3 dan ULG1E2 (*S.marcescens*) tidak menghasilkan asam salisilat. Sedangkan BD4.2E1 (*B.cereus* P14), SN1E4 (*Bacillus sp* HI), SN2E2 (*B.cereus* Se07) dan PU2E2 (*Bacillus sp* SJI) menghasilkan asam salisilat dengan kandungan berturut-turut 14.72 ppm/ml, 14.40 ppm/ml, 13.96 ppm/ml dan 14.67 ppm/ml.. Isolat BD4.2E1 (*B.cereus* P14) yang mampu menekan severitas HDB tertinggi (64.30 %), juga tertinggi dalam kemampuannya menghasilkan asam salisilat (14.72 ppm/ml). Sedangkan isolat ULG1E2 (*S.marcescens*) yang terendah dalam penekanan severitas HDB (17.28 %), tidak menghasilkan asam salisilat. Namun pada isolat JB1E3 (*S.marcescens*) dengan penekanan severitas HDB 58.96 %, juga tidak menghasilkan asam salisilat. Hal ini menunjukkan bahwa pada isolat JB1E3 (*S.marcescens*) terdapat faktor lain yang

berperan dalam penekanan penyakit HDB selain asam salisilat.

Tabel 2: Karakter fisiologis isolat bakteri endofit terpilih dalam mengendalikan penyakit HDB pada bawang merah

	Isolat Endofit	Karakter Fisiologis			
		Penekanan severitas HDB (%)*	Asam Salisilat (ppm/ml)	Antibiotik zona hambat (mm)	Kolonisasi Akar (cfu/g)
1	<i>B.cereus</i> P14 (BD4.2E1)	64,30	14,72	0,00	4,41 x 10 ⁵
2	<i>Bacillus sp</i> SJI (PU2E2)	61,06	14,67	18,25	4,84 x 10 ⁵
3	<i>Bacillus sp</i> HI (SN1E4)	59,01	14,40	20,25	3,20 x 10 ⁵
4	<i>S.marcescens</i> (JB1E3)	58,96	0,00	14,25	9,03 x 10 ⁵
5	<i>B.cereus</i> Se07(SN2E2)	28,32	13,96	16,25	6,20 x 10 ⁵
6	<i>S.marcescens</i> (ULG1E2)	17,28	0,00	17,25	5,45 x 10 ⁵

Ket: Hasil penelitian tahap I (4.1.1)

Produksi Antibiotik

Kemampuan isolat bakteri endofit dalam menghasilkan senyawa antibiotik ditampilkan pada tabel 5. Kemampuan menghasilkan antibiotik ditunjukkan dengan adanya zona hambat disekeliling kertas cakram. Isolat SN1E4 (*Bacillus sp* HI) menghasilkan zona hambat terbesar yaitu 20.25 mm diikuti oleh isolat PU2E2 (*Bacillus sp* SJI) yaitu 18.25 mm, Isolat ULG1E2 (*S.marcescens*) yaitu 17.25 mm, isolat SN2E2 (*B.cereus* Se07) yaitu 16.25 mm, dan isolat JB1E3 (*S.marcescens*) yaitu 14.25 mm. Sedangkan isolat BD4.2 E1 (*B.cereus* P14) yang mempunyai kemampuan penekanan penyakit tertinggi (64.30 %), tidak mampu menghasilkan antibiotik. Dua isolat yang

tidak menghasilkan asam salisilat yaitu JB1E3 dan ULG1E2 (*S.marcescens*) juga menghasilkan ant-ibiotik dengan diameter zona hambat 14.25 ppm/ml dan 17.25 ppm/ml.

Kolonisasi bakteri endofit dalam jaringan akar bawang merah

Populasi bakteri endofit dalam jaringan akar bawang merah ditampilkan pada Tabel 2. Enam isolat bakteri endofit indigenus terpilih dapat dire-isolasi kembali dari jaringan akar setelah seminggu (7 hari) inokulasi. Hal ini menunjukkan bahwa isolat endofit tersebut mampu bertahan pada jaringan akar (mampu mengkolonisasi jaringan akar bawang merah), dengan jumlah populasi sampai 9.03×10^5 cfu/g akar pada minggu pertama pengamatan (*S.marcescens* JB1E3). Isolat BD4.2E1 (*B.cereus* P14) yang mampu menekan severitas HDB tertinggi juga dapat mengkolonisasi jaringan akar bawang merah dengan jumlah populasi 4.41×10^5 . Jumlah populasi bakteri dalam jaringan akar bawang merah cenderung stabil pada semua isolat pada masing-masing minggu pengamatan. Kolonisasi endofit dapat bertahan sampai minggu ke 5 (35 hari) setelah inokulasi (gambar 19), dan tidak ditemukan adanya kerusakan akibat keberadaannya pada jaringan akar tanaman bawang merah. .

Pada semua isolat endofit terpilih terjadi penurunan jumlah populasi dari minggu pertama sampai minggu ke lima pengamatan. Penurunan yang cukup tinggi mulai terjadi pada minggu ke tiga yaitu pada isolat SN2E2 (*B.cereus* Se07) dan JB1E3 (*S.marcescens*). Pada minggu ke empat dan ke lima penurunan populasi yang tajam terjadi pada isolat

PU2E2 (*Bacillus sp* SJI). Sedangkan isolat BD4.2E1 (*B.cereus* P14) dan isolat ULG1E2 (*S.marcescens*) penurunan populasinya dari minggu ke minggu relatif stabil. Penurunan populasi isolat pada minggu ke tiga sampai ke empat diduga karena bakteri telah ditranslokasikan pada bagian lain dari jaringan tanaman, atau bakteri telah berpindah dari jaringan akar ke bagian tanaman lainnya.

Karakterisasi fisiologis bakteri endofit indigenus terpilih dalam meningkatkan hasil bawang merah

Produksi IAA

Produksi IAA dari isolat bakteri endofit indigenus terpilih ditampilkan pada Tabel 3 .Semua isolat yang diuji menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Isolat JB1E3 (*S.marcescens*) memiliki kandungan IAA tertinggi yaitu 93.56 ppm/ml, diikuti dengan isolat PU2E2 (*Bacillus sp* SJI) dengan konsentrasi 64.16 ppm/ml, isolat BD4.2E1 (*B.cereus* P14) dengan konsentrasi 56.56 ppm/ml, isolat SN2E2 (*B.cereus* Se07) dengan konsentrasi 45.56 ppm/ml, isolat SN1E4 (*Bacillus sp* HI) dengan konsentrasi 42.56 ppm/ml, dan yang terendah pada isolat ULG1E2 (*S.marcescens*) dengan konsentrasi 37.96 ppm/ml. Isolat SN2E2 (*B.cereus* Se07) yang tertinggi dalam peningkatan hasil (214.85 %) juga mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi 45.56 ppm/ml dan isolat ULG1E2 (*S.marcescens*) (212.78%) dengan konsentrasi IAA 37.96 ppm/ml

Tabel 3. Karakter fisiologis isolat bakteri endofit terpilih dalam meningkatkan hasil bawang merah

No	Isolat endofit	Peningkatan Hasil (%) ^a	Karakter Fisiologis	
			Produksi IAA (ppm/ml)	Kapasitas
1	SN2E2 (<i>B.cereus</i> Se07)	214,85	45,56	0
2	ULG1E2 (<i>S.marcescens</i>)	212,78	37,96	3 Sedang
3	PU2E2 (<i>Bacillus sp</i> SJI)	91,31	64,16	0
4	SN1E4 (<i>Bacillus sp</i> HI)	89,08	42,56	0
5	JB1E3 (<i>S.marcescens</i>)	70,77	93,16	4 Tinggi
6	BD4.2E1 (<i>B.cereus</i> P14)	50,65	56,56	2 Sedang

Ket: Hasil penelitian tahap I (4.1.1)

Produksi Pelarut Fosfat

Kemampuan enam isolat bakteri endofit terpilih dalam melarutkan fosfat ditampilkan pada tabel 6, dari enam isolat yang diuji tiga isolat menunjukkan kemampuan melarutkan fosfat dengan adanya zona bening sekitar koloni bakteri di medium *Pikovskaya*. Isolat bakteri endofit yang mampu melarutkan fosfat tersebut adalah isolat BD4.2E1 (*B.cereus* P14) yang tertinggi dalam penekanan severitas HDB, JB1E3 (*S.marcescens*) peningkatan hasil 70.77 % dan ULG1E2 (*S.marcescens*) peningkatan hasil 212.78 %, sedangkan isolat bakteri endofit yang tidak mampu melarutkan fosfat adalah isolat PU2E2 (*Bacillus sp* SJI), SN2E2 (*B.cereus* Se07) yang tertinggi dalam peningkatan hasil, 214.85 %, dan SN1E4 (*Bacillus sp* HI). Isolat JB1E3 (*S.marcescens*) memiliki kapasitas kelarutan fosfat yang tinggi yaitu 4, dan dua isolat lainnya BD4.2E1 (*B.cereus* P14) dan ULG1E2 (*S.marcescens*) memiliki kapasitas

kelarutan fosfat yang sedang (Silva dan Vidor, 2000).

Identifikasi molekular Bakteri endofit terpilih

Isolat BD4.2E1 memiliki kemiripan 99 % dengan *Bacillus cereus* P14, dengan kode akses JN700160. Isola JB1E3 dan ULG1E2 memiliki kemiripan 96 % dengan *Serratia marcescens* PPM4, kode akses JQ308604.1. Isolat SN2E2 memiliki kemiripan 96 % dengan *Bacillus cereus* Se07, kode akses JN700112.1. Isolat dengan penekanan severitas HDB tertinggi (BD4.2E1) merupakan bakteri *Bacillus cereus* P14. Isolat SN2E2 yang terbaik dalam meningkatkan hasil merupakan bakteri *Bacillus cereus* Se07 (tabel 7)

Tabel 4 : Jenis bakteri endofit indigenus bawang merah terpilih berdasarkan analisis BLAST

No	Kode Isolat	Identitas	Kode Akses	% kemiripan
1	BD42E1	<i>Bacillus cereus</i> P14	JN700160	99
2	SN1E4	<i>Bacillus sp.</i> H1(2008)	EU 711350.1	98
3	SN2E2	<i>Bacillus cereus</i> Se07	JN700112.1	96
4	PU2E2	<i>Bacillus sp.</i> SJI	GQ258753	83
5	ULG1E2	<i>Serratia marcescens</i> PPM4	JQ308604.1	96
6	JBE3	<i>Serratia marcescens</i> PPM4	JQ308604.1	96

Karakterisasi Respon Fisiologis Tanaman Bawang Merah yang diintroduksi dengan Bakteri Endofit Indigenus terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri

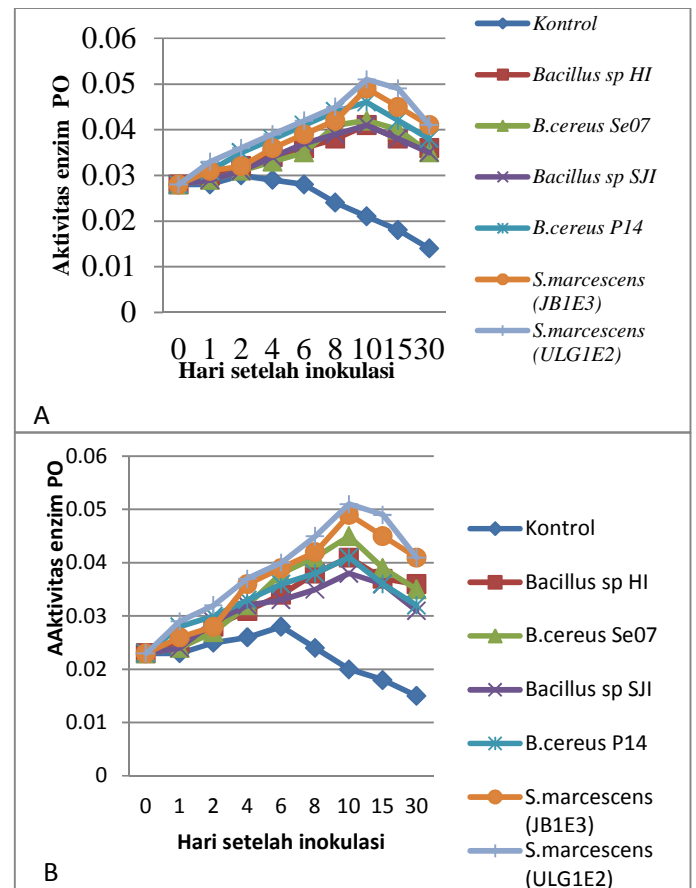
Karakterisasi respon fisiologis kemampuan tanaman bawang merah terinduksi menghasilkan enzim pertahanan

Enzim Peroksidase (PO)

Analisis PO pada akar dan daun bawang merah yang diintroduksi bakteri endofit indigenus dan diinokulasi dengan patogen *Xaa* menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Aktivitas PO masih dapat dideteksi dari 0 – 30 hsi, peningkatan aktivitas mulai dari 0 – 10 hsi, selanjutnya turun sampai 30 hsi (Gambar 6). Pada kontrol peningkatan terjadi sampai 2 hsi selanjutnya turun dari 4 hsi sampai 30 hsi. Aktivitas enzim PO pada akar dan daun memiliki kecenderungan yang hampir sama.

Peningkatan aktivitas PO pada akar antara 50 – 192.86 % dibandingkan kontrol. Pada 30 hsi peningkatan tertinggi pada *S.marcescens* (JB1E3 dan ULG1E2) yaitu 192.86 % . Peningkatan aktivitas PO pada daun bawang merah 30 hsi antara 106.67 – 173.33 % dibandingkan kontrol. Perlakuan pada bakteri *S.marcescens* (ULG1E2 dan JB1E3) menunjukkan aktivitas PO tertinggi pada 30 hsi yaitu 0,041 µg/ml (Gambar 6 B) dengan peningkatan aktivitas 173.33 %. Peningkatan aktivitas PO juga terjadi pada tanaman kontrol (tanpa perlakuan bakteri endofit), meningkat sampai 6 hsi dan turun mulai 8 – 30 hsi. Hal ini terjadi

sebagai reaksi dari tanaman terhadap infeksi patogen (*Xaa*) dan pelukaan daun sebelum inokulasi patogen.



Gambar 6. Grafik aktivitas enzim peroksidase pada akar (A) dan Daun (B) bawang merah yang telah diintroduksi Bakteri endofit indigenus terpilih dan diinokulasi dengan *Xaa* (21 hst)

Terjadinya peningkatan aktivitas PO pada akar dan daun tanaman bawang merah yang diintroduksi dengan bakteri

endofit indigenus terpilih, merupakan salah satu indikasi terjadinya induksi ketahanan sistemik terhadap HDB pada bawang merah. Aktivitas PO berperan penting dalam mekanisme penguatan dinding sel tanaman (lignifikasi) dan produksi senyawa-senyawa fenolik. Penguatan dinding sel tanaman dapat menghambat proses infeksi awal patogen karena patogen memerlukan nutrisi yang diperoleh dari dalam sel tanaman. Selain itu, sel tanaman berperan sebagai tempat berlangsungnya mekanisme yang mengatur aktivitas respon pertahanan tanaman terhadap serangan patogen.

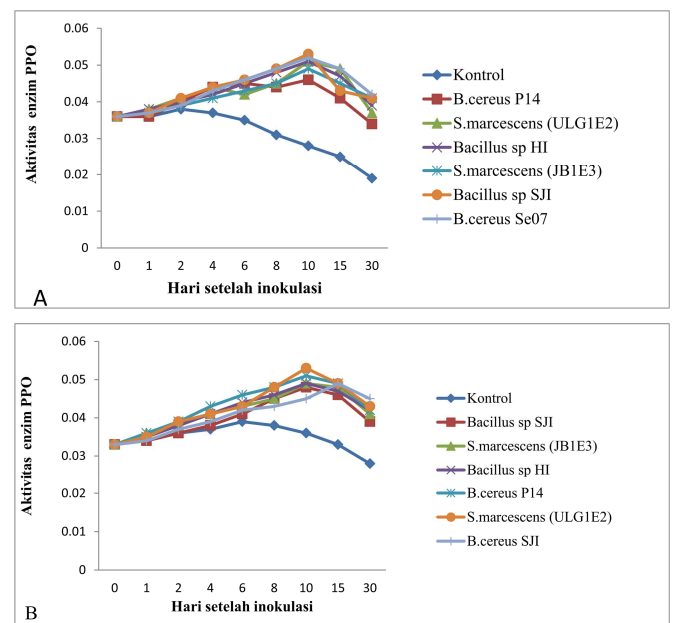
Enzim *Polifenol Oksidase (PPO)*

Aktivitas enzim PPO pada akar dan daun tanaman bawang merah yang diintroduksi isolat bakteri endofit dan diinokulasi dengan patogen *Xaa* ditampilkan pada Gambar 7. Aktivitas PPO pada akar dan daun yang diintroduksi isolat endofit indigenus lebih tinggi dibandingkan kontrol. Peningkatan aktivitas PPO pada akar dan daun bawang merah yang diintroduksi bakteri endofit mulai 0 hsi sampai 30 hsi, dan meningkat mulai 0 hsi sampai 10 hsi, selanjutnya turun sampai 30 hsi.

Aktivitas PPO pada daun dan akar bawang merah menunjukkan kecenderungan yang hampir sama. Peningkatan aktivitas PPO pada akar bawang merah yang diintroduksi bakteri endofit indigenus antara 105.26 – 121.05 % dibanding kontrol. Perlakuan yang diintroduksi *B.cereus* Se07 (SN2E2) pada 30 hsi menunjukkan aktivitas PPO yang tertinggi yaitu 0.042 $\mu\text{g/ml}$ (gambar 7 A) dan meningkat 121.05 % dibanding kontrol (lampiran 9).

Peningkatan aktivitas PPO pada daun 30 hsi berkisar antara 39.29 – 60.71 %, Isolat dengan peningkatan PPO tertinggi adalah *B.cereus* Se07 (SN2E2) yaitu 0.045 $\mu\text{g/ml}$ (gambar 7 B), dengan peningkatan aktivitas 60.71 % dibanding kontrol..

Peningkatan aktivitas PPO menunjukkan terjadinya induksi ketahanan pada tanaman bawang merah terhadap HDB. Enzim PPO berperan dalam pembentukan lignin dan senyawa fenol yang akan memperkuat struktur dinding sel tanaman dari serangan patogen. Peningkatan aktivitas PPO ini dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap HDB



Gambar 7. Grafik aktivitas enzim *Polifenol Oksidase (PPO)* pada akar (A) dan daun (B) bawang merah yang telah diintroduksi Bakteri endofit indigenus terpilih dan diinokulasi dengan *Xaa* (21 hst)

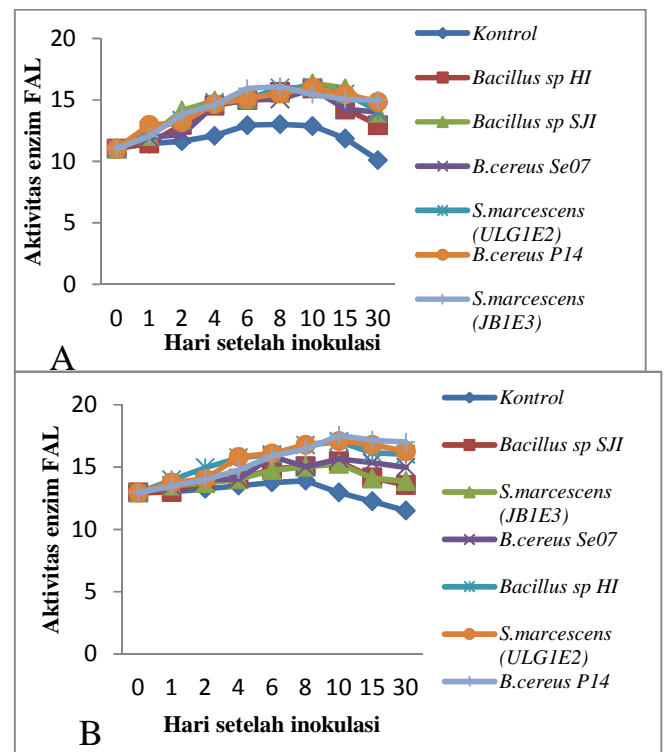
Enzim *Phenylalanine ammonia lyase* (PAL)

Aktivitas enzim PAL pada akar dan daun tanaman bawang merah yang diintroduksi dengan isolat endofit indigenus dan diinokulasi dengan patogen *Xaa* ditampilkan pada Gambar 8. Aktivitas PAL pada daun dan akar yang diintroduksi isolat bakteri endofit indigenus lebih tinggi dibandingkan kontrol, dan dapat dideteksi mulai 0 – 30 hsi. Pada akar yang diintroduksi bakteri endofit, aktivitas PAL meningkat mulai 0 – 10 hsi, kemudian turun sampai 30 hsi. Pada kontrol, peningkatan aktivitas PO terjadi sampai 8 hsi, selanjutnya turun dari 10 – 30 hsi. (Gambar 8 A) Peningkatan aktivitas PAL pada 30 hsi antara 28.22 – 48.52 % dibanding kontrol. Pada 30 hsi, aktivitas PAL tertinggi pada perlakuan yang diintroduksi bakteri endofit terpilih *S.marcescens* (JB1E3) yaitu 15 µg/ml (gambar 6 A), dengan peningkatan 48.52 %.

Pada daun, aktivitas PAL, meningkat dari 0 – 10 hsi, kemudian turun sampai 30 hsi (gambar 6 B). Peningkatan aktivitas PAL 30 hsi dibanding kontrol antara 17.83 – 47.65 %. Peningkatan aktivitas PAL tertinggi (30 hsi), pada perlakuan yang diintroduksi dengan *B.cereus* P14 (BD4.2E1) yaitu 16.98 µg/ml, dengan peningkatan aktivitas 47.65 % dibanding kontrol. Aktivitas PAL pada perlakuan Kontrol juga mengalami peningkatan sampai 8 hsi, kemudian turun dari 10 – 30 hsi.

Peningkatan aktivitas PAL pada akar dan daun bawang merah mampu meningkatkan ketahanan tanaman bawang merah terhadap HDB. *B.cereus* P14 (BD4.2E1) dengan aktivitas PAL tertinggi juga memiliki persentase pe-

nekanan penyakit HDB tertinggi bila dibandingkan kontrol (hasil penelitian pada poin 3.1.1.2).. Enzim PAL berperan dalam pembentukan fitoaleksin dan senyawa fenol yang menekan serangan patogen pada tanaman.



Gambar 8 : Grafik aktivitas enzim PAL pada akar (A) dan daun (B) bawang merah yang diintroduksi dengan bakteri endofit dan diinokulasi *Xaa* (21 hst)

Karakterisasi respon fisiologis kemampuan tanaman bawang merah terinduksi menghasilkan asam salisilat

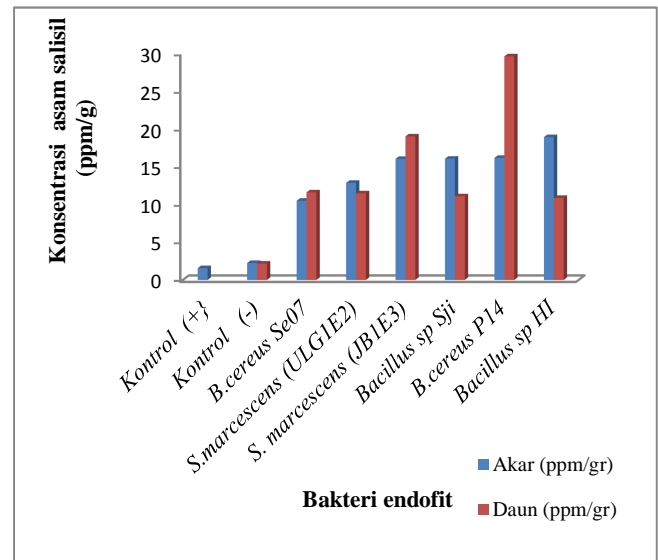
Asam salisilat dari akar dan daun tanaman bawang merah yang diin-

roduksi dengan bakteri endofit terpilih dan tahan terhadap penyakit HDB, ditampilkan pada Gambar 9. Kandungan asam salisilat ditemukan pada semua perlakuan kecuali kontrol (+) pada daun, namun konsentrasinya beragam. Asam salisilat pada akar dan daun bawang merah yang diintroduksi isolat bakteri endofit memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Pada kontrol (+) dan kontrol (-) akar konsentrasinya sangat rendah dibandingkan perlakuan dengan introduksi bakteri endofit indigenus terpilih (1.55 dan 2.22 ppm/g), Sedangkan pada . kontrol (-) daun tidak terdapat kandungan asam salisilat. Rata-rata konsentarsi pada akar lebih tinggi dibandingkan pada daun kecuali pada perlakuan introduksi *S.marcescens* (JB1E3), *B.cereus* Se07 (SN2E2) dan *B.cereus* P14 (BD4.2E1) (Gambar 9). Konsentasi paling tinggi terdapat pada perlakuan introduksi bakteri endofit *B.cereus* P14 (BD4.2E1) yaitu 29.62 ppm/gr (tabel 10)..

Pada kontrol (+) dan (-) akar serta kontrol (-) daun juga ditemukan kandungan asam salisilat dalam konsentrasi yang rendah (Gambar 7). Hal ini karena pada kondisi normal semua tanaman menghasilkan asam salisilat namun dalam konsentrasi kecil. Peningkatan konsentrasi terjadi bila ada *trigger* berupa agen hayati (bakteri endofit) ataupun adanya infeksi patogen.

Asam salisilat ditemukn pada bagian akar yang merupakan tempat introduksi isolat bakteri endofit. Selain pada akar, asam salisilat juga ditemukan pada bagian daun tanaman bawang merah, diduga hal ini karena asam salisilat ditraslokasikan dari akar menuju daun tanaman bawang merah. Kon-

sentrasi pada daun cenderung lebih rendah dibandingkan pada akar, kecuali pada *B.cereus* P14 (BD4.2E1), *S.marcescens* (JB1E3) dan *B.cereus* Se07 (SN2E2) yang konsentrasinya lebih tinggi pada daun (gambar 7).



Gambar 9. Grafik perbandingan konsentrasi asam salisilat pada akar dan daun bawang merah yang diintroduksi bakteri endofit indigenus terpilih (21 hst)

Tingginya kandungan asam salisilat pada akar dan daun yang diintroduksi isolat bakteri endofit indigenus, berhubungan dengan tingkat ketahanan tanaman terhadap HDB. Bakteri *B.cereus* P14 (BD4.2E1) yang memiliki kandungan asam salisilat tertinggi (29.62 ppm/g) juga mampu menekan severitas penyakit HDB tertinggi yaitu 64.30 % dengan kriteria tahan. Bakteri *B.cereus* Se07 (SN2E2)

dan *S.marcescens* (ULG1E2) yang kandungan asam salisilat pada akarnya lebih rendah daripada bakteri endofit lain, berkorelasi positif dengan kemampuan penekanan severitas HDB yang juga lebih rendah dari bakteri endofit yang lain (tabel 10). Kandungan asam salisilat yang tinggi merupakan indikasi terjadinya mekanisme induksi ketahanan pada tanaman bawang merah yang diintroduksi dengan bakteri endofit.

Pembahasan Umum

Isolasi bakteri endofit dari dari sentra bawang merah di Kab. Agam dan Kab. Solok, diperoleh 82 isolat endofit indigenus bawang merah. Jumlah ini lebih banyak dibandingkan dengan hasil penelitian lain. Alameda and Rivera, (2009), berhasil mengisolasi bakteri endofit pada biji bawang Bombay dan memperoleh 74 isolat yaitu dari genus *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* dan *Micrococcus* Selanjutnya Suriaman *et al*, (2012), memperoleh 8 isolat bakteri endofit diazotrof dari akar dan daun bawang merah yaitu dari genus *Azotobacter*, *Bacillus* dan *Pseudomonas*.

Sseleksi *in planta* terhadap kemampuan 82 isolat bakteri endofit indigenus dalam menekan penyakit HDB pada bawang merah, diperoleh enam isolat yang potensial dikembangkan sebagai agen biokontrol (*Biocontrol Agents* = BcA) dan pemacu pertumbuhan tanaman (*Plant Growth Promoting Bacteria* = PGPB). Bakteri *B.cereus* P14 (BD4.2E1), *Bacillus* sp H1 (SN1E4), *Bacillus* sp SJ1 (PU2E2), *S.marcescens* (JB1E3), potensial dikembangkan sebagai BcA, karena bakteri

endofit tersebut mampu menekan severitas HDB sampai lebih dari 64 % (Gambar 3), dan hasil ini lebih baik dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian Nawangsih *et al*, (2011) diperoleh dua isolat bakteri endofit (isolat BC 4 dan BL 10 yang diisolasi dari tanaman tomat) mampu mengendalikan penyakit layu pada tomat, isolat BC 4 menekan insidensi penyakit 33 % dan isolat BL 10 menekan insidensi penyakit 43 %. Purnawati *et al* (2014), menguji kemampuan isolat bakteri endofit dalam menekan penyakit layu pada tanaman tomat, dan mendapatkan dua isolat (PS 1 dan Ps 8) setelah masa inkubasi 15 – 16 hari di rumah kaca mampu menekan penyakit 8.0 % - 9.19 %.

Bakteri endofit *B.cereus* Se07 (SN2E2) dan *S.marcescens* (ULG1E2), potensial sebagai PGPB dan bersifat toleran. Kedua bakteri ini mampu meningkatkan berat basah dan berat kering umbi sampai lebih dari 200 % (tabel 5). Kemampuan ini jauh lebih baik dari penelitian lainnya, antara lain penelitian Harish *et al* (2009) mengenai pengaruh bioformulasi campuran isolat *Pseudomonas fluorescens* (Pf1) dan *Bacillus* sp (EPB 22) pada pisang meningkatkan hasil 53.33 % dibandingkan kontrol. Dawwam *et al*, (2013) isolat bakteri endofit P35 dari ubi jalar mampu meningkatkan berat basah tunas dan berat kering tunas ubi jalar masing-masing 2.6 dan 2.02 kali lebih tinggi dari kontrol. Meningkatkan berat basah dan berat kering akar ubi jalar masing-masing 2.47 dan 2.3 kali lebih tinggi dari kontrol. Bakteri endosit yang mampu meningkatkan hasil bawang merah ini pun ternyata juga mampu menekan penyakit HDB (lebih dari 28 %). Ini menunjukkan bahwa isolat

bakteri endofit tersebut bersifat toleran, walaupun bergejala HDB namun masih dapat berproduksi maksimal (Ribeiro do Vale *et al.* (2001)

Karakter fisiologis isolat bakteri endofit yang mampu menekan HDB dan meningkatkan pertumbuhan dan hasil bawang merah, secara *in vitro* bervariasi. Pada isolat yang mampu menekan HDB juga memiliki kemampuan dalam menghasilkan antibiotik, asam salisilat dan mengkolonisasi jaringan akar dengan cepat. Bakteri endofit tersebut adalah *Bacillus* sp SJ1 (SN1E4), *Bacillus* sp HI (PU2E2), dan *B. cereus* Se07 (SN2E2). Sedangkan *B. cereus* P14 (BD4.2E1) tidak menghasilkan antibiotik tapi dapat mengkolonisasi jaringan akar bawang merah, dan *S. marcescens* (ULG1E2 dan JB1E3) tidak menghasilkan asam salisilat, tapi dapat menghasilkan antibiotik dan mengkolonisasi jaringan akar bawang merah. Sehingga bakteri endofit *Bacillus* sp SJ1 (SN1E4), *Bacillus* sp HI (PU2E2), dan *B. cereus* Se07 (SN2E2) memiliki multi mekanisme dalam menekan HDB yaitu secara tidak langsung (induksi ketahanan) dan secara langsung (antibiosis dan kompetisi). Pada *B. cereus* P14 (BD4.2E1) juga bersifat multi mekanisme karena menekan HDB dengan mekanisme tidak langsung (induksi ketahanan) dan secara langsung (kompetisi). Sedangkan Bakteri *S. marcescens* (ULG1E2 dan JB1E3), mekanisme penekanan HDB dengan cara langsung (antibiosis dan kompetisi). Menurut Van Loon (2007), mekanisme penekanan penyakit oleh agen biokontrol dapat terjadi secara langsung melalui produksi senyawa antimikroba, enzim lytic, siderofor, dan parasitisme. Mekanisme yang tidak langsung melalui

mekanisme induksi ketahanan.. Selanjutnya menurut Pal *et al* (2006) agen biokontrol yang paling efektif dalam menekan patogen adalah yang memiliki multi mekanisme.

Berdasarkan analisis korelasi, karakter fisiologis bakteri endofit yang lebih berperan dalam penekanan penyakit HDB adalah kolonisasi jaringan akar oleh bakteri endofit, Nilai koefisien korelasi ($r = 0.739$) untuk korelasi antara kolonisasi akar dengan penurunan severitas HDB lebih tinggi dibandingkan karakter fisiologis lainnya (asam salisilat dan antibiotik). Peningkatan populasi bakteri endofit pada jaringan akar tanaman akan menekan severitas penyakit HDB pada bawang merah. Bakteri endofit berfungsi sebagai *trigger* untuk merangsang tanaman menghasilkan ketahanan terhadap patogen. Beberapa bakteri pemacu pertumbuhan tanaman (PGPR) dapat melindungi tanaman dari patogen melalui aktivitas biokontrol. (Van loon, 2007). Kemampuan ini dapat terjadi melalui mekanisme yang berbeda-beda, antara lain dengan kemampuan bakteri men-*trigger* jalur sinyal ketahanan spesifik yang dikenal juga dengan induksi ketahanan sistemik (Bakker *et al*, 2007). Menurut Kloepper and Ryu (2006), kapasitas elisidasi induksi ketahanan sistemik (ISR = *Induce Systemic Resistance*) berkaitan dengan jumlah populasi bakteri dalam jaringan akar.

Beberapa peneliti sebelumnya telah melaporkan bahwa bakteri endofit mampu mengendalikan penyakit tanaman melalui mekanisme induksi ketahanan sistemik. Wei *et al.* (1991) melaporkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* strain 89B-61 menginduksi ketahanan sistemik terhadap penyakit antraknos

pada tanaman mentimun melalui aplikasi pada benih. *Serratia marcescens* strain 90-166 mampu menginduksi ketahanan sistemik tanaman mentimun terhadap berbagai macam penyakit (Press *et al.* 2001). Harish *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa aplikasi bakteri endofit dan rizobakteria mampu menekan penyakit *Banana Bunchy Top Virus* sebesar 60% melalui mekanisme induksi ketahanan sistemik.

Karakter sebagai pemacu pertumbuhan tanaman dari enam bakteri endofit juga bervariasi, namun semuanya mampu menghasilkan IAA, sehingga dapat dikatakan mampu berperan sebagai PGPB. Enam isolat endofit bawang merah yang potensial sebagai BcA juga potensial sebagai PGPB. Bakteri endofit telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dapat berperan sebagai BcA dan PGPB. Diantaranya Dalal *et al* (2013) mendapatkan 5 bakteri endofit (3 dari genus *Pseudomonas* dan 2 dari genus *Bacillus*) yang mempunyai kemampuan sebagai agen biokontrol terhadap jamur patogen tanah dan mampu memacu pertumbuhan tanaman kedelai. Selanjutnya Hadiwiyono dan Widodo (2012) memperoleh 3 isolat bakteri endofit (B04, B05 dan B10) yang antagonis terhadap BDB dan *Foc* serta mampu memacu pertumbuhan mikro plant-let pisang. Ji *et al* (2010) menyatakan, *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1 adalah bakteri endofit yang dapat memperbanyak diri dan menyebarkan dalam bibit murbei secara cepat dan efisien, bersifat antagonis terhadap *C. dematium* dan dapat berperan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman (PGPB).

Tanaman bawang merah yang dikolonisasi bakteri endofit menunjukkan respon ketahanan, dari kriteria agak

tahan sampai tahan. Enam isolat yang potensial sebagai BcA dan PGPB yang diintroduksi pada tanaman bawang merah, menyebabkan tanaman tahan terhadap penyakit HDB. Respon fisiologis tanaman tahan tersebut ditunjukkan dengan peningkatan aktivitas enzim pertahanan tanaman (PO, PPO, dan PAL) dan peningkatan konsentrasi asam salisilat pada akar dan daun bawang merah. Aktivitas enzim pertahanan pada bawang merah masih dideteksi sampai 30 hsi patogen *Xaa* baik pada akar maupun daun bawang merah, sedangkan penelitian sebelumnya hanya mampu mendeteksi kasus bahkan hanya dalam keberadaan enzim pertahanan sampai 14 hsi, dibebberapa hitungan jam. Seperti penelitian Rajendran *et al* (2006), mendeteksi kandungan enzim PPO tertinggi pada 48 jam setelah inokulasi, dan enzim PAL meningkat pada 24 jam setelah inokulasi *Xanthomonas campestris pv malvacearum* pada kapas. Selanjutnya Inshida *et al* (2008) menyatakan, Rhizobakteria dan acibenzolar S- methyl (ASM) menginduksi peningkatan aktivitas PO, PAL dan β 1-3 glukanase pada 14 hsi tanaman kapas dengan *Xanthomonas campestris pv malvacearum*.

Produksi enzim pertahanan (PO, PPO, dan PAL) pada bawang merah mengindikasikan respon fisiologis ketahanan sistemik pada tanaman terhadap patogen *Xaa*, karena produksi enzim dapat dideteksi pada akar maupun daun bawang merah. Kolonisasi jaringan akar bawang merah oleh bakteri endofit berkorelasi dengan peningkatan aktivitas enzim pertahanan (PO, PPO dan PAL) pada akar dan daun bawang merah. Kolonisasi jaringan akar oleh bakteri endofit meningkatkan aktivitas enzim

pertahanan lebih tinggi (mencapai 192,86 %) di banding kontrol. Nilai koefisien korelasi tertinggi terdapat pada korelasi antara kolonisasi akar dengan aktivitas enzim PO pada akar ($r = 0.984$), selanjutnya korelasi dengan aktivitas enzim PAL pada akar ($r = 0.972$), dan PPO pada daun ($r = 0.925$).

Peningkatan aktivitas PO, PPO dan PAL, berhubungan dengan peran enzim pertahanan tersebut sebagai enzim pembentuk lignin (PO dan PPO) dan senyawa anti mikroba (PAL). Aktivitas PO dan PPO menyebabkan aktivasi dan pembentukan mekanisme pertahanan primer seperti lignifikasi (Goodman *et al*, 1986). Enzim ini berperan dalam biosintesa dan oksidasi fenol untuk memproduksi lignin sebagai bagian dari induksi ketahanan primer pada inang (Stermer and Hamersmidt, 1984).

Peningkatan aktivitas PO lebih tinggi dibandingkan PPO dan PAL, enzim PO meningkat sampai 192.86 %, enzim PPO meningkat sampai 173.33 %, sedangkan enzim PAL hanya meningkat sampai 48.52 %. Bakteri endofit yang mampu menginduksi aktivitas enzim PO tertinggi pada tanaman bawang merah adalah *S.marcescens*, (JB1E3) bakteri endofit yang menginduksi aktivitas PPO tertinggi adalah *B.cereus* Se07 SN2E2) sedangkan *B.cereus* P14 (BD4.2E1) menginduksi aktivitas PAL tertinggi pada bawang merah. Penelitian Ting *et al* (2010), menemukan bakteri endofit *Serratia marcescens* (galur UPM39B3), juga mampu meninduksi produksi enzim pertahanan (PO, PPO dan PAL) pada plantlet pisang yang tahan terhadap layu *Fusarium*.

Asam salisilat dapat dideteksi pada akar dan daun bawang merah,

dengan kandungan tertinggi diinduksi oleh bakteri endofit *B. cereus* P14 (BD4.2E1) sebesar 29.62 ppm/g. Kandungan asam salisilat meningkat 13 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol. Peningkatan konsentrasi asam salisilat ini berkorelasi positif dengan kemampuannya dalam menekan severitas HDB, dengan nilai koefisien korelasi (r) 0.921. Bakteri *B.cereus* P14 (BD4.2E1) juga mampu menekan severitas HDB tertinggi (64 %). Peningkatan kandungan asam salisilat ini juga mengindikasikan terjadinya induksi ketahanan tanaman bawang merah terhadap *Xaa*.

Peningkatan kandungan asam salisilat pada tanaman yang diberi perlakuan bakteri endofit telah dilaporkan oleh penelitian lain. Kloepper & Ryu (2006), melaporkan bahwa kolonisasi bakteri endofit *Bacillus pumilus* SE34 pada *Arabidopsis* menginduksi ketahanan sistemik terhadap *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* yang berhubungan dengan jalur asam salisilat. Forchetti *et al.* (2010) melaporkan bahwa perlakuan bakteri endofit *Achromobacter xylosoxidans* dan *Bacillus pumilus* memproduksi asam salisilat dan menghambat pertumbuhan jamur patogen. Asam salisilat mempunyai peranan penting dalam jalur sinyal yang menyebabkan induksi ketahanan sistemik (SAR = *Systemic Acquired Resistance*) dan berhubungan dengan akumulasi protein PR (*pathogenesis-related*), seperti PR1 (Lyon 2007).

Kandungan asam salisilat ditemukan pada akar (bagian yang diintroduksi bakteri endofit) dan pada daun, ini terjadi diduga karena asam salisilat ditranslokasikan pada bagian lain dari tanaman. Beberapa peneliti

menyatakan akumulasi senyawa asam salisilat berkaitan dengan respon fisiologis tanaman terhadap infeksi patogen. Peningkatan kandungan asam salisilat pada akar yang diintroduksi *Pseudomonas fluorescens* dapat dideteksi pada bagian akar, dan pada bagian lainnya dari tanaman. Hasil ini menunjukkan biosintesa asam salisilat pada bagian yang diintroduksi dan kemudian ditranslokasikan ke bagian lain dari akar (Saikia *et al*, 2003).

Kolonisasi bakteri endofit pada jaringan akar bawang merah merangsang tanaman untuk mengaktifkan sistem pertahanannya melalui produksi enzim pertahanan (PO, PPO dan PAL) dan asam salisilat. Bakteri endofit berfungsi sebagai *trigger* yang merangsang ketahanan tanaman terhadap patogen. Tanaman merespon kolonisasi endofit dengan mengaktifkan enzim pertahanannya dan memproduksi asam salisilat.

Penelitian tentang respon tanaman yang diinduksi secara sistemik (ISR) juga mempelajari jalur sinyal transduksi pada tanaman untuk menentukan perubahan biokimia pada tanaman selama proses ISR. Berdasarkan model yang dikemukakan oleh Pieterse *et al* 1998 *cit* Kloepper and Ryu (2006), ISR tidak tergantung pada asam salisilat namun tergantung pada asam jasmonat dan regulator gen *npr-1*. Pada penelitian ini menunjukkan fenomena yang berbeda, tanaman bawang merah yang diinduksi dengan bakteri endofit menunjukkan peningkatan kandungan asam salisilat pada akar dan daunnya. Selanjutnya menurut Kloepper and Ryu (2006), sinyal spesifik pada jalur transduksi yang diaktifkan selama proses ISR

tergantung pada tanaman inang dan patogennya.

Penelitian kemampuan bakteri endofit dalam menekan penyakit HDB ini dilakukan dengan teknik seleksi secara *in planta*. Hasil yang didapatkan memberikan bukti bahwa bakteri endofit berperan tidak saja sebagai BcA tapi juga mampu berperan sebagai PGPB pada bawang merah. Menurut Habazar (2014), teknik *in planta* memiliki beberapa kelebihan diantaranya teknik ini lebih mudah, murah dan dapat digunakan untuk mengkarakterisasi kemampuan mikroba sebagai agen biokontrol dan sebagai pemacu pertumbuhan dan hasil. Selain itu juga dapat mengkarakterisasi mekanisme agen biokontrol yang bersifat langsung ataupun tidak langsung (induksi ketahanan).

Penelitian ini dilaksanakan secara komprehensif, mulai dari eksplorasi bakteri endofit dan seleksi endofit sebagai agen biokontrol pengendali penyakit HDB, pemacu pertumbuhan dan hasil bawang merah, karakterisasi fisiologis secara *in vitro* dari isolat endofit yang potensial dan respon fisiologis dari tanaman yang diintroduksi bakteri endofit tersebut. Sehingga hasil yang diperoleh juga memberikan bukti menyeluruh tentang jenis bakteri endofit, karakter endofit sebagai agen biokontrol dan pemacu pertumbuhan dan hasil, serta respon tanaman akibat interaksinya dengan bakteri endofit pada bawang merah. Penelitian seperti ini belum banyak dilakukan, umumnya penelitian terdahulu hanya menguji kemampuan dalam menekan penyakit saja atau dalam meningkatkan pertumbuhan saja.

Kesimpulan

1. Berdasarkan penapisan secara *in planta* 82 isolat bakteri endofit dari dua sentra produksi bawang merah di Sumatera Barat, diperoleh enam isolat yang mampu menurunkan severitas penyakit HDB yaitu : *B. cereus* P14 (7,83 %), *Bacillus* sp. SJI (8,54 %), *S.marcescens* isolat JB1E3 (8,99 %), *Bacillus* sp. HI (9,00 %), *B.cereus* Se07 (15,72 %), dan *S.marcescens* isolat ULG1E2 (18,14 %), dibandingkan kontrol (21, 93 %). Enam isolat ini juga mampu meningkatkan ketahanan tanaman dari agak rentan menjadi tahan.
2. Karakter fisiologis bakteri endofit indigenus yang mampu mengendalikan penyakit HDB bervariasi. Berdasarkan nilai koefisien korelasi, kolonisasi jaringan akar oleh bakteri endofit indigenus merupakan karakter yang paling berperan dalam penurunan severitas penyakit HDB pada bawang merah ($r = 0,739$), dibandingkan dengan produksi asam salisilat ($r = 0,529$) dan produksi antibiotik ($r = 0,265$).
3. Respon fisiologis tanaman bawang merah yang diintroduksi dengan bakteri endofit indigenus menunjukkan peningkatan aktivitas enzim pertahanan (PO, PPO dan PAL) dan kandungan asam salisilat pada akar dan daun yang bervariasi. Kolonisasi oleh bakteri endofit *S.marcescens* meningkatkan aktivitas enzim PO tertinggi, kolonisasi *B.cereus* Se07 meningkatkan aktivitas enzim PPO tertinggi dan kolonisasi

B.cereus P14 meningkatkan aktivitas enzim PAL serta kandungan asam salisilat tertinggi. Berdasarkan nilai koefisien korelasi peningkatan aktivitas PAL berkorelasi dengan peningkatan kandungan asam salisilat pada akar dan daun bawang merah ($r = 0,880$).

4. Enam bakteri endofit indigenus yang mampu mengendalikan penyakit HDB juga mampu meningkatkan hasil bawang merah. *B.cereus* Se07 (produksi 15,22 ton/ha) dan *S.marcescens* isolat ULG1E2 (produksi 15,12 ton/ha) mampu meningkatkan produksi melebihi produksi kultival medan (7,4 ton/ha) dan mendekati produksi optimal bawang merah (16 ton/ha), walaupun terserang penyakit HDB (dua bakteri ini bersifat toleran).

Saran

Pada penelitian ini diperoleh bakteri endofit indigenus yang mampu meningkatkan produksi sangat baik, walaupun terserang penyakit HDB (bersifat toleran). Sehingga perlu penelitian lebih lanjut terhadap karakter bakteri endofit indigenus yang bersifat toleran tersebut.

Daftar Pustaka

- Alameda, M and Rivera, L. 2007. Endophytic and pathogenic bacteria isolated from onion seeds in Puerto Rico. Abstrak. Resúmenes sociedad puertorriquena de ciencias Agrícolas Reunion Científica Annual. Puerto Rico.

- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by Fluorescent *Pseudomonas spp.*, *Phytopathology* 97, 239-243
- Bandara, W.M.M.S., Seneviratne, G., Kulasooriya., S.A., 2006. Interaction among endophytic bacteria and fungi; effects and potentials. *J. Biosci* 31 (5). : 645-650
- BPS {Badan Pusat Statistik} Produksi sayuran Indonesia 2012. Laporan tahunan produksi pangan 2012.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E., 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and environmental microbiology* 57: 535-538..
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., and Barka E A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microb.* 71:4951-4 959.
- Dalal, J and Kulkarni, N. 2015. Antagonistic and Plant Growth Promoting potential of indigenous endophytic bacteria of Soybean (*Glycine max (L) Merrill*). *Currens research and biotechnology*. 1 (2): 62-69.
- Dawwan. G.E., Elbeltagy. A., Emara. H.M., Abbas. I.H., Hassan. M.M., 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science*. 58(2): 195-201
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Izaguirre, MJ., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G. 2010. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Curr Microbiol* 61:485-493
- Goodman RN, Kiraly Z, Wood KR. 1986. *The biochemistry and physiology of plant disease*. Columbia: University of Missouri Press. p. 433.
- Habazar., T., Nasrun, Jamsari, Rusli. I., 2007. Pola penyebaran penyakit hawar daun bakteri (*Xanthomonas axonopodis pv allii*) pada bawang merah dan upaya pengendaliannya melalui imunisasi menggunakan rhizobacteria. Laporan hasil penelitian KKP3T. Universitas Andalas bekerjasama dengan Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Habazar, T. 2014. In *Planta Technique for Screening of Rhizobacteria to Control Bacterial Plant Pathogens*. Paper presented in: Internasional Seminar of Indonesian Society of Microbiology (ISISM), Padang. October 15 - 18th.
- Hadiwiyono and Widono, S., 2012. Endophytic Bacillus: the Potentiality of Antagonism to Wilt

- Pathogen and Promoting Growth to Micro-Plantlet of Banana in Vitro. *Biomirror* 3 (06): 1-4.
- Hallmann J., Quadt- Hallmann Q.A., Mahaffee W.F., and Kloepper J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.* 43:895–914
- Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianaihasundaram, K. and Samiyappn, R. 2008. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against banana bunchy top virus. *Appl. Soil Ecol.*, 39: 187 – 200.
- Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P. and Samiyappan, R. 2009, Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. *Biol. Control.*, 51:16–25
- Klement, Z.K., Rudolph and D.C. Sand., 1990. *Methods in phytobacteriology.* Academic Kiado. Budapest.
- Kloepper, J.W. and Ryu, C.M., 2006. Microbial root endophytic in B.Schulz, C, Boyle, T.N. Sieber Editor. *Soil Biology* volume 9. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp: 35-52.
- Lugtenberg B., and Kamilova F . 2009. Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 63:541–56.
- Lyon G. 2007. Agents that can elicit induced resistance. *In* : Walters D, Newton A, Lyon G. Editor. *Induced Resistance for Plant Defence : Sustainable Approach to Crop Protection.* Blackwell Publishing. pp.9-30.
- Miller F.H., and Berg G. 2009. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (4):149–155.
- Nasrun. 2005. Studi pengendalian hayati penyakit layu bakteri (*Ralfsonia solanacearum*) Nilam dengan *Pseudomonas fluorescens*. {Disertasi}. Pasca sarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 118 hal.
- Nawangsing. A.A., Damayanti. I., Wiyono. S., Kartika. J.G., 2011. Selection and characterization of endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. *Hayati. journal of biosciences.* 18 (2) : 66-70.
- Pal, K. K. and Gardener B. M. S., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Paulraj, L., dan L. W., O' Garro . 1993. Leaf Bliight of Onion in Barbados Caused By *Xanthomonas campestris*. *Plant Dis.* 86:3330.
- Premono. E., 1998. Mikroba pelarut fosfat untuk mengefisienkan pupuk fofpor dan prospeknya di

- Indonesia. Hayati. Vol 5 No. 4. 89-94.
- Purnawati, A., Sasrahidayat, I.R., Abadi, A.L., Hadiastono, T., 2014. Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. Journal of Tropical life science. 4 (1) : 33 – 36.
- Resti, Z., Yanti, Y., Rahma, H. 2007. Distribusi Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada tanaman Bawang (*Xanthomonas axonopodis pv allii*) Sebagai Penyakit Baru di Sumatera Barat. Laporan Penelitian DIPA Unand. Universitas Andalas. Padang.
- Ribeiro do valei, F.X., Parlevliet, J.E., and Zambolimi, L. 2001. Concepts in Plant Disease Resistance. Fitopatol. bras. 26(3): 577 -589
- Roumagnac, P., Pruvost, O., Chiroleu, F., dan Hughes, H. 2004. Spatial and Temporal Analysis of Bacterial Blight of Onion Caused By *Xanthomonas axonopodis pv allii*. Phytopathology. 94 : 138 - 146.
- Saikia, R., Sing, T., Kumar, R., Srivatsvs, J., Srivastava, A.K., Singh, K., 2003. Role of Salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Microbiol. Rev. 158:b203 – 213.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A R. 1997. DNA Sequencing with chain terminating inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 : 5463 – 5467.
- Schaad N.W, Jones J.B, Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St Paul: The American Phytopatology Society.
- Schwartz, H. F., and Gent, D.H., 2006. Xanthomonas Leaf Blight Of Onion ([http //www. Extcolestate. edu/push/gorden html](http://www.Extcolestate.edu/push/gorden.html) access 22-02-2006).
- Silva. H S A., Romeiro. R S., Macagnan. D., 2004. Rhizobacterial and induction of systemic resistance in tomato plant: non-specific protection and increase in enzyme activities. Biological Control. 29: 288-295
- Strange, R N., 2003. Introduction to plant pathologi. John Willey and Sons Ltd. England.
- Suriaman, E., Surtiningsih, T., Matuzahroh, N. 2012. Eksplorasi dan identifikasi bakteri endofit diazotrof dari bawang merah (*Allium ascalonicum*. L) kultivar Bima. Proceeding seminar Natural Biodiversity IV. ISBN : 978-979-9810. Universitas Airlangga Surabaya.
- Stermer BA, Hammerschmidt R. 1984. Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidase activity in cucumber. Physiol Plant Pathol. 25:239–249.
- Ting, A.S.Y., Meon, S., Kadir, J., and Singh, G., 2010. Induction of

host defence enzymes by the endophytic bacterium *Serratia marcescens*, in banan plantlets. *International Journal of Pest Management*. 56, (2): 183–188

Van Loon L.C., 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol*. 119:243–254.

Wang Y., Zeng Q., Zhang Z., 2010. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium H-6. *African Journal of Biotechnology*, 9(37):6140-6145.

Zinniel, D.K., Pat Lambrecht, B., Harris, Z., Feng, D., Kuczmariski, P., Higley, C.A., Ishimaru, A., Arunakumari, R. G., Barletta and Vidaver. A. k. 2002. Isolation dan Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria From Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. P. 2198-2208.