

ISOLASI DAN KARAKTERISASI KANDIDAT BAKTERI ENTOMOPATOGEN DARI TANAMAN PADI (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI PEST BACTERIA CANDIDATES FROM RICE PLANTS)

Rizki Adiputra Taopan¹, Endang Sulistyorini², Di Ajeng Prameswari³, Siti Nurzakiah⁴

Program Studi Agronomi, Universitas Katolik Indonesia Santu Paulus Ruteng¹, Program Studi Agroteknologi, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa², Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Institut Pertanian Bogor^{3,4}

Ruteng, Nusa Tenggara Timur, Indonesia¹, Banten, Indonesia², Bogor, Indonesia^{3,4}
rizkimicro@gmail.com¹, endangsulistyorini@yahoo.com², ajengprameswari9392@yahoo.com³,
sitinurzakiah1@gmail.com⁴

ABSTRAK

Serangan hama menjadi permasalahan dalam pembangunan pertanian berkelanjutan. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi kandidat bakteri entomopatogen. Isolat kandidat entomopatogen di isolasi dari filosfer padi dan rhizosfer padi. Karakterisasi dilakukan meliputi uji pH, uji motilitas, uji Gram, uji kebutuhan oksigen, uji fermentasi gula (glukosa dan laktosa), dan uji katalase. Hasil isolasi diperoleh lima isolat yaitu FP1, FP2, FP3, RP1 dan RP2. Semua isolat entomopatogen tidak dapat beradaptasi pada pH asam (pH 3), sedangkan isolat RP2 dapat tumbuh dengan baik pada pH 6-9. Semua isolat kandidat entomopatogen bersifat non motil. Uji Gram menunjukkan semua isolat bersifat gram negatif serta berbentuk kokus dan hanya isolat FP1 yang berbentuk basil. Uji kebutuhan oksigen menunjukkan isolat entomopatogen bersifat aerob (FP1 dan FP2), aerotoleran (FP3) dan anaerob (RP1 dan RP2). Uji fermentasi gula menunjukkan isolat RP1 dapat memanfaatkan glukosa dan laktosa. Uji katalase menunjukkan semua isolat entomopatogen positif.

Kata Kunci: Bakteri, entomopatogen isolasi, karakterisasi.

ABSTRACT

Pest attacks are a problem in sustainable agricultural development. In this study, the isolation and characterization of candidate entomopathogen bacteria were carried out. Entomopathogen candidate isolates were isolated from the rice phyllosphere and rice rhizosphere. Characterization was carried out including pH test, motility test, Gram test, oxygen demand test, sugar fermentation test (glucose and lactose), and catalase test. The isolation results obtained five isolates, namely FP1, FP2, FP3, RP1, and RP2. All isolates could not adapt to acidic pH (pH 3), while RP 2 isolates could grow well at pH 6-9. All isolates of candidates were non-motile. Gram test showed that all isolates were gram-negative and cocci-shaped and only FP1 isolates were bacilli. The oxygen demand test showed that the isolates were aerobic (FP1 and FP2), aerotolerant (FP3), and anaerobic (RP1 and RP2). The sugar fermentation test showed that RP1 isolate could utilize glucose and lactose. The catalase test showed that all the antifungal isolates were positive.

keyword: Bacteria, characterization, entomopathogen isolation.

PENDAHULUAN

Serangan hama masih menjadi permasalahan yang dialami petani dalam usaha budidaya. Petani cenderung mengaplikasikan insektisida sintesis untuk mengontrol serangan hama (Krishanti NPRA dkk, 2017). Penggunaan pestida sintesis dapat menyebabkan resistensi serangga, musnahnya entomofauna nontarget, predator alami, parasitoid dan polinator, serta pencemaran lingkungan (Ruiu, Satta & Floris, 2013). Pola pengendalian hama terpadu telah dikembangkan menggunakan agens hayati untuk mengendalikan hama, seperti mikroba entomopatogen.

Entomopatogen yang meliputi jamur, virus, protozoa dan bakteri dapat mengontrol populasi serangga (Roy & Cottrell, 2008). Bakteri entomopatogen memiliki mekanisme kompleks dalam mengendalikan hama (Deka, Baruah & Babu, 2021). Beberapa bakteri dapat menghasilkan protein kristal protoksin yang bersifat insektisidal. Spora dan kristal protein ini terbukti efektif dalam mengendalikan serangga ordi diptera, lepidoptera, dan coleoptera (Pigott & Ellar, 2007). Aplikasi bakteri entomopatogen dapat secara tunggal atau dikombinasikan dengan insektisida.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri kandidat entomopatogenik. Kandidat bakteri entomopatogenik selanjutnya akan dimanfaatkan sebagai agens hayati dalam mengendalikan hama.

METODE PELAKSANAAN

Pengambilan Sampel

Sampel bakteri entomopatogen diambil dari lahan sawah di Kabupaten Sukabumi, Desa Cidahu. Sampel terdiri dari sampel filosfer dan rhizosfer padi. Padi yang dipilih adalah padi yang tidak terserang hama.

Isolasi

Sampel masing-masing diencerkan dalam 9 mL garam fisiologis 0,85%, kemudian dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} masing-masing di sebar (*pour plate*) sebanyak 0,1 mL ke media LB (dilakukan duplo), selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati koloni yang terbentuk. Koloni-koloni yang terpisah dan menunjukkan perbedaan morfologi selanjutnya diambil 1 ose dan dilakukan streak kuadran, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur murni yang

diperoleh selanjutnya dipindahkan ke media LB dan disimpan di kulkas sebagai biakan kerja.

Uji Ph

Isolat yang diperoleh masing-masing diambil 1 ose dan diencerkan dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Pengenceran 10^{-5} dipindahkan sebanyak 1 mL ke dalam 9 mL media LB cair dengan pH masing-masing 3, 5, 6, 7 dan 9. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan pH diukur menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 600 nm.

Uji Motilitas

Isolat entomopatogen diambil masing-masing 1 ose dan dipindahkan ke media LB tegak dengan metode tusukan. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati tipe koloni pada media tegak serta motilitas isolat.

Uji Gram

Kaca objek ditetesi 1-2 akuades steril, kemudian diletakan masing-masing 1 ose biakan. Kaca objek dikering anginkan dan difiksasi diatas Bunsen. Hasil fiksasi dibubuhkan Cristal Violet, didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya dibubuhkan Iodin, didiamkan selama 2 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan pemucatan dengan alkohol 96% kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan dekolorisasi dengan safranin, didiamkan selama 30 detik kemudian dibilas dengan air mengalir. Kelebihan cat diserap dengan tissue. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X.

Uji Kebutuhan Oksigen

Isolat yang diperoleh masing-masing diambil 1 ose dan diencerkan dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Selanjutnya pengenceran 10^{-5} diambil sebanyak 1 mL dan dipindahkan ke 9 mL media LB cair, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Diamati persebaran isolat pada media dan ditentukan tipe kebutuhan oksigennya.

Uji Fermentasi Gula (Glukosa dan Laktosa)

Isolat yang diperoleh masing-masing diambil 1 ose dan diencerkan dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Selanjutnya pengenceran 10^{-5} diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam 9 mL

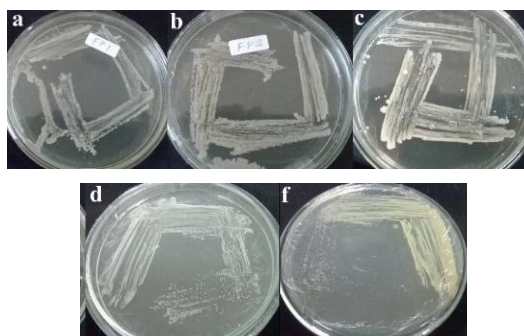
media LB yang mengandung masing-masing 1% glukosa dan laktosa, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati uji positif yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham.

Uji Katalase

Isolat yang diperoleh masing-masing diambil 1 ose kemudian diletakan diatas gelas objek steril. Isolat kemudian ditetesi H₂O₂ dan diamati terbentuknya gelembung gas yang menandakan uji positif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

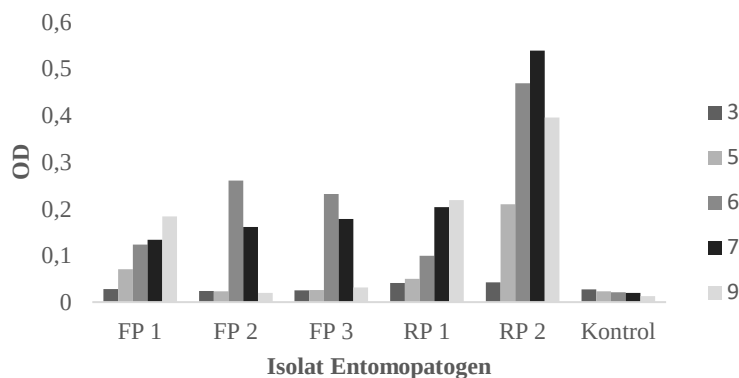
Isolasi bakteri kandidat entomopatogen dilakukan menggunakan media Luria Bertani Agar (LA) dengan dua sumber sampel yaitu filosfer padi dan rhizosfer padi. Hasil isolasi dari sampel filosfer padi didapatkan 3 isolat yaitu FP1, FP2, dan FP3, sedangkan dari sampel rhizosfer padi diperoleh dua isolat yaitu RP1 dan RP2. Isolat kandidat entomopatogen sebagian besar mempunyai bentuk koloni putih dan bervariasi dalam ukurannya. Isolat yang diisolasi dari filosfer padi yaitu FP1 dan FP2 berukuran kecil sedangkan isolat FP3 berukuran sedikit lebih besar. Isolat FP1 dan FP3 menunjukkan koloni berwarna putih, sedangkan isolat FP2 berwarna putih kekuningan. Isolat dari sampel rhizosfer padi keduanya membentuk koloni bulat, dimana isolat RP1 berwarna putih sedangkan isolat RP2 berwarna kuning.



Gambar 1. Isolat kandidat entomopatogen yang diisolasi dari filosfer padi dan rhizosfer padi.
a=FP1, b=FP2, c=FP3, d=RP1, e=RP2.

Uji pH dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada pH yang berbeda yaitu 3, 5, 6, 7 dan 9. Setelah inkubasi, dilakukan pengukuran kepadatan sel menggunakan spektrofotometer uv-vis. Perlakuan pada pH yang berbeda bertujuan untuk mengetahui pola adaptasi isolat terhadap rentang pH serta untuk mengetahui pH optimum dan maksimum isolat. Hasil pengamatan pada Gambar 2 menunjukkan beberapa isolat dapat

beradaptasi pada pH basa, yaitu isolat RP2. Sebagian besar isolat dapat tumbuh dengan baik pada rentangan pH 5-7. Toleransi pH yang beragam memungkinkan aplikasi pada berbagai kondisi pH yang berbeda.



Gambar 2. Optical density (OD) isolat entomopatogen pada pH yang berbeda

Uji motilitas isolat dilakukan dengan menginokulasikan isolat ke media LA semisolid. Metode yang digunakan adalah metode tusukan yang bertujuan untuk mengamati motilitas bakteri serta tipe koloninya pada sekitar daerah tusukan. Uji positif motilitas ditandai dengan persebaran isolat disekitar media, sedangkan uji negatif jika isolat hanya tumbuh disekitar bekas tusukan. Berdasarkan hasil pengamatan isolat bersifat non motil karena hanya tumbuh di sekitar bekas tusukan. Motilitas berperan penting dalam kemampuan bakteri entomopatogen. Bakteri entomopatogen motil lebih invasif daripada non-motil (Easom & Clarke, 2008). Namun, terdapat juga beberapa bakteri entomopatogen yang bersifat non-motil, seperti *Enterobacter aerogens* dan *Actinobacter* sp (Roy & Cottrell, 2008).

Hasil pengamatan pada perbesaran 40 kali menunjukkan semua isolat bersifat gram negatif serta berbentuk kokus dan hanya isolat FP1 yang berbentuk basil. Bakteri gram negatif telah dikenal memiliki kemampuan pengendalian hama, seperti *Bacillus thuringiensis* (Deka dkk., 2021). Easom & Clarke (2008) melaporkan bakteri gram negatif *Photorhabdus* sp dapat menginfeksi nematoda pada fase inaktif. Roy & Cottrell, (2008) melaporkan bakteri entomopatogen simbiotik gram negatif dan berbentuk batang yang diisolasi dari nematoda.

Uji kebutuhan oksigen dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media LA Cair. Hasil pengamatan menunjukkan isolat yang diisolasi dari filosfer padi yaitu FP1 dan FP2 bersifat aerob serta FP3 bersifat aerotoleran, sedangkan isolat yang diisolasi dari rhizosfer padi yaitu RP1 dan RP2 bersifat anaerob. Uji fermentasi gula dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media yang mengandung 1% gula, yaitu glukosa dan laktosa. Hasil positif ditunjukkan dengan

terbentuknya gas pada tabung Durham. Pada beberapa isolat dilakukan uji tunda selama 24 jam untuk memastikan kemampuan fermentasi gula. Hasil pengamatan pada tabel 1 menunjukkan pada isolat entomopatogen hanya isolat RP1 yang dapat memanfaatkan glukosa dan sukrosa sebagai sumber karbon. Hasil uji kebutuhan oksigen dan fermentasi gula ini dapat menjadi acuan dalam pengaplikasian bakteri entomopatogen, seperti formulasi media pembawa.

Isolat		Sumber Gula	
		Glukosa	Laktosa
Entomopatogen	FP1	-	-
	FP2	-	-
	FP3	-	-
	RP1	+	+
	RP2	-	-

Uji katalase dilakukan dengan mereaksikan isolat dengan hidrogen peroksida (H_2O_2). Uji positif ditandai dengan adanya gelembung gas yang mengindikasikan isolat dapat mengkonversi H_2O_2 menjadi O_2 menggunakan enzim katalase. Berdasarkan hasil pengamatan ditemukan bahwa semua isolat menghasilkan gelembung gas.

KESIMPULAN

Isolat entomopatogen sebagian besar tumbuh pada pH netral, non-motil, gram negatif, kokus kecuali isolat FP1, katalase positif, fermentasi gula negatif kecuali isolat RP1.

DAFTAR PUSTAKA

- Deka, B., Baruah, C., & Babu, A. (2021). Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00466-7>
- Easom, C. A., & Clarke, D. J. (2008). Motility is required for the competitive fitness of entomopathogenic *Photobacterium luminescens* during insect infection. *BMC Microbiology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-168>
- Krishanti, N. P. R. A., Wikantoso, B., & Zulfitri, A. (2017). Bakteri Entomopatogen Sebagai Agen Bio kontrol Terhadap Larva. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 16(1), 1–110.
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal

Toxin Activity . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255–281.
<https://doi.org/10.1128/membr.00034-06>

Roy, H. E., & Cottrell, T. E. (2008). Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. *European Journal of Entomology*, 105(3), 391–398. <https://doi.org/10.14411/eje.2008.049>

Ruiu, L., Satta, A., & Floris, I. (2013). Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. *Bulletin of Insectology*, 66(2), 181–186.