

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI
TUMBUHAN GEMBOLO (*Dioscorea bulbifera*) PENGHASIL ENZIM
KITINASE SEBAGAI AGEN BIOKONTROL**

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC
BACTERIA FROM GEMBOLO (*Dioscorea bulbifera*) PRODUCING THE
ENZYME CHITINASE AS BIOCONTROL AGENT

**VIVI ALFI YUNITA
H012211004**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI
TUMBUHAN GEMBOLO (*Dioscorea bulbifera*) PENGHASIL ENZIM
KITINASE SEBAGAI AGEN BIOKONTROL**

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Kimia

Disusun dan diajukan oleh

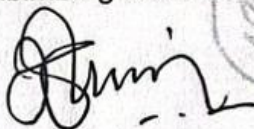
VIVI ALFI YUNITA
H012211004

Kepada

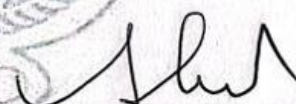
**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

TESIS**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI
TUMBUHAN GEMBOLO (*Dioscorea bulbifera*) PENGHASIL ENZIM
KITINASE SEBAGAI AGEN BIOKONTROL****VIVI ALFI YUNITA****NIM: H012211004**

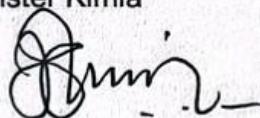
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Kimia Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada tanggal 29 November 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui**Pembimbing Utama**

Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 196203201987112001

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Ahyar Ahmad
NIP. 196712311991031020

**Ketua Program Studi
Magister Kimia**

Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 196203201987112001

**Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin**

Dr. Eng. Amiruddin, M.Si
NIP. 197205151997021002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vivi Alfi Yunita

Nomor Mahasiswa : H012211004

Program Studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 4 Desember 2023

Yang menyatakan

Vivi Alfi Yunita



UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan Syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat Rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT DARI TUMBUHAN GEMBOLO (*Dioscorea bulbifera*) PENGHASIL ENZIM KITINASE SEBAGAI AGEN BIOKONTROL** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam kepada Nabi besar Muhammad S.A.W.

Kepada kedua orang tua tercinta, Bapak **Abu Bakar** dan Ibu **Halija**. Ucapan terima kasih yang sangat besar dan tak terhingga untuk setiap semangat, motivasi, bantuan, kasih sayang dan doa yang tidak henti-hentinya diberikan kepada saya.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian tesis ini, terutama kepada Ibunda **Prof. Hasnah Natsir, M.Si** dan Ayahanda **Prof. Dr. Ahyar Ahmad** selaku penasehat untuk penulis yang senantiasa meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan arahan yang baik, terutama dalam penyelesaian penelitian ini.

Penulis juga tidak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayahanda **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc** selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf pegawai.
2. Ayahanda **Dr. Eng. Amiruddin, S.Si, M.Si** selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf pegawai.
3. Ibunda **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku Ketua Program Studi S2 Kimia Universitas Hasanuddin, beserta dosen dan staf yang telah membantu penulis dalam perjalanan menyelesaikan pendidikan ini.
4. Dosen penguji ujian, yaitu Ayahanda **Prof. Dr. Abd. Wahid, M.Sc**, Ibunda **Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto S., M.S**, dan Ibunda **Dr. Seniwati Dali, M.Si**.
5. Seluruh **Analisis Laboratorium** di Departemen Kimia, terkhusus untuk Ibu **Fitria Azis, S.Si**. selaku analisis Laboratorium Biokimia UIN Alauddin Makassar, dan Departemen Pertanian terkhusus Laboratorium Hama dan Penyakit Universita

Hasanuddin atas bantuan serta arahannya selama penelitian berlangsung.
Terima kasih atas bantuan dan Kerjasamanya.

6. Pak Irsan dan Ibu Risky Mahira yang telah membantu penulis dalam hal administrasi selama menempuh pendidikan.
7. Teman-teman Angkatan 2021 Ganjil atas bantuan dan semangat selama penulis menempuh pendidikan.
8. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penulis menyelesaikan tesis ini.

Penulisan sadar bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhir kata, semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi pembacanya dan terutama bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Oktober 2023

Penulis

ABSTRAK

VIVI ALFI YUNITA, **Identifikasi dan karakterisasi Bakteri Endofit dari Tumbuhan Gembolo (*Dioscorea bulbifera*) Penghasil Enzim Kitinase Sebagai Agen Biokontrol** (dibimbing oleh Hasnah Natsir dan Ahyar Ahmad)

Pestisida alami dibuat dengan memanfaatkan strain bakteri sebagai ketersediaan nutrisi tanaman, yang di peroleh dari akar tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*), sebagai penghasil bakteri kitinolitik dalam memproduksi enzim kitinase dijadikan sebagai biokontrol pada tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan menguji aktivitas kitinolitik bakteri endofit, selanjutnya menguji aktivitas agensi biokontrol sebagai PGPR pembuatan biopestisida. Penelitian diawali dengan isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri endofit dari tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*) kemudian produksi kitinase dan uji aktivitas agen biokontrol sebagai PGPR. Hasil penelitian menunjukkan, berdasarkan karakteristik diperoleh bakteri endofit dari akar tumbuhan gembolo 6 isolat bakteri yang terindikasi mampu menghasilkan enzim kitinase. Isolat terpilih yaitu isolat K4 dari tumbuhan gembolo mempunyai kemiripan sebesar 97,93% dengan *Enterobacter cloacae*, sehingga bakteri endofit ini dinamakan *Enterobacter cloacae* K4-G. Bakteri *E. cloacae* K4-G mampu menghasilkan enzim kitinase maksimal pada waktu 48 jam dengan aktivitas sebesar 0,0312 U/mL. Hasil karakterisasi enzim kitinase dari *E. cloacae* K4-G menunjukkan kondisi optimum dicapai pada: pH 6 (0,021 U/mL), suhu 37 °C (0,056 U/mL) dan konsentrasi substrat 2,5% (0,2467 U/mL). Enzim kitinase dan bakteri *E. cloacae* K4-G dapat menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum*. Isolat *E. cloacae* K4-G juga mampu memproduksi hormon siderofor, pembentukan asam sianida (HCN) dan pembentukan senyawa volatil. Oleh karena itu, enzim kitinase dan bakteri *E. cloacae* K4-G dapat digunakan sebagai agen biokontrol pada tanaman.

Kata Kunci : Bakteri Endofit, *Enterobacter cloacae*, Kitinase, Kitinolitik

ABSTRACT

VIVI ALFI YUNITA. **Identification and Characterization of Endophytic Bacteria from Gembolo (*Dioscorea bulbifera*) Producing the Enzyme Chitinase as Biocontrol Agents** (supervised by Hasnah Natsir and Ahyar Ahmad)

Natural pesticides are made by utilizing bacterial strains as the availability of plant nutrients, obtained from the roots of gembolo plants (*Dioscorea bulbifera*), as a producer of chitinolytic bacteria in producing chitinase enzymes used as a biocontrol on plants. This study aims to isolate, identify and test the chitinolytic activity of endophytic bacteria, then test the activity of biocontrol agents as PGPR for making biopesticides. The research began with the isolation, identification and characterization of endophytic bacteria from gembolo plants (*Dioscorea bulbifera*) then the production of chitinase and testing the activity of biocontrol agents as PGPR. The results showed, based on the characteristics of endophytic bacteria obtained from the roots of gembolo plants, 6 bacterial isolates were indicated to be able to produce chitinase enzymes. The selected isolate, namely isolate K4 from gembolo plants, has a similarity of 97.93% with *Enterobacter cloacae*, so this endophytic bacterium is called *Enterobacter cloacae* K4-G. *E. cloacae* K4-G bacteria were able to produce chitinase enzyme at 48 hours with an activity of 0.0312 U/mL. The characterization results of chitinase enzyme from *E. cloacae* K4-G showed that the optimum condition was achieved at: pH 6 (0.021 U/mL), temperature 37 °C (0.056 U/mL) and substrate concentration 2.5% (0.2467 U/mL). Chitinase enzyme and *E. cloacae* K4-G bacteria can inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* fungus. *E. cloacae* K4-G isolate is also capable of producing siderophore hormone, cyanide acid (HCN) formation and volatile compound formation. Therefore, the chitinase enzyme and bacteria *E. cloacae* K4-G can be used as biocontrol agents in plants.

Keywords: Endophytic Bacteria, *Enterobacter cloacae*, Chitinase, Chitinolytic

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Gembolo (<i>Dioscorea bulbifera</i>)	6
2.2. Isolasi Mikroorganisme.....	8
2.3. Bakteri Endofit.....	9
2.4. Mikroba Antagonis.....	13
2.5. Bakteri Kitinolitik.....	15
2.6. Enzim Kitinase.....	16
2.7. Pertumbuhan Tanaman Mempromosikan Rizobakteri (PGPR) Sebagai Biokontrol.....	19
2.8. Spektrofotometer UV-Vis.....	23
2.9. Spektrofotometer GC-MS.....	24
2.10. Kerangka Pikir dan Hipotesis.....	25
BAB III METODE PENELITIAN.....	28
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	28
3.2. Alat dan Bahan.....	28
3.2.1. Alat Penelitian.....	28

3.2.2. Bahan Penelitian.....	28
3.3. Prosedur Kerja.....	29
3.3.1. Preparasi Sampel Akar Tumbuhan Gembolo (<i>Dioscorea bulbifera</i>).....	29
3.3.2. Persiapan Substrat, Pembuatan Koloidal Kitin dan Pembuatan Media.....	29
3.3.3. Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Gembolo.....	32
3.3.4. Identifikasi Bakteri.....	33
3.3.5. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Kitinase dan Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri Kitinolitik.....	34
3.3.6. Pengukuran Aktivitas Kitinase.....	35
3.3.7. Penentuan Kadar Protein.....	36
3.3.8. Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Endofit Tumbuhan Gembolo.....	36
3.3.9. Penentuan Berat Molekul dengan Menggunakan SDS-Page.....	37
3.3.10. Uji Antagonis Bakteri Terhadap Patogen.....	38
3.3.11. Uji Antagonis Enzim Kitinase Terhadap Patogen.....	38
3.3.12. Uji Biokontrol Bakteri Endofit Sebagai Pertumbuhan Tanaman Mempromosikan Rizobakteri.....	38
BAB IV PEMBAHASAN.....	41
4.1. Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tumbuhan Gembolo (<i>Dioscorea bulbifera</i>)	41
4.2. Skrining Bakteri Endofit Penghasil Enzim Kitinase.....	43
4.3. Identifikasi gen 16S rRNA Molecular Assay Bakteri Kitinolitik K4....	44
4.4. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Kitinase dan Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G.....	46
4.5. Pengukuran Aktivitas Kitinase dan Kadar Protein.....	47
4.6. Karakterisasi Enzim Kitinase dari <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G.....	48
4.7. Penentuan Berat Molekul Protein Kitinase.....	52
4.8. Uji Antagonis Bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G Terhadap <i>Fusarium oxysporum</i>	53
4.9. Uji Antagonis Enzim Kitinase Terhadap <i>Fusarium oxysporum</i>	54
4.10. Uji biokontrol Bakteri Endofit Sebagai Pertumbuhan Tanaman Mempromosikan Rizobakteri.....	55
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	59

5.1. Kesimpulan.....	59
5.2. Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN.....	77

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1	Hasil Isolasi Mikroba Rhizosfer dan Pengujian Daya Antagonisnya dari Tumbuhan Jahe.....	14
2	Hasil Penelitian Terkait Produksi Kitinase Oleh Berbagai Mikroorganisme.....	19
3	Karakterisasi morfologi isolat bakteri dari tumbuhan gembolo (<i>Dioscorea bulbifera</i>)	42
4	Hasil skrining indeks kitinolitik.....	43
5	Hasil Penelitian dan Penelitian Terdahulu pada Uji Siderofor.....	56

DAFTAR GAMBAR

nomor		halaman
1	Tumbuhan <i>Dioscorea</i> sp.....	6
2	Tumbuhan Gembolo (<i>Dioscorea bulbifera</i>).....	7
3	Reaksi pemutusan diasetil kitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc [8,9,10].....	18
4	Prinsip Kerja Spektrofotometer UV-Vis.....	23
5	Prinsip Kerja Spektrofotometer GC-MS.....	25
6	Kerangka Pikir Penelitian.....	26
7	Hasil PCR isolat K4 menggunakan primer 16s rRNA (M = 1 kb plus ladder)	44
8	Pohon filogenetik isolat K4 yang diperoleh dari database NCBI berdasarkan urutan gen 16S rRNA.....	45
9	Pengaruh waktu produksi enzim kitinase <i>E. cloacae</i> K4-G selama 72 jam.....	46
10	Pengaruh waktu inkubasi terhadap kadar protein dan aktivitas enzim kitinase dari <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G.....	48
11	Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase pada suhu 37°C dan konsentrasi substrat 1%.....	49
12	Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase dari <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G pH 6 dan konsentrasi substrat 1%.....	50
13	Pengaruh konsentrasi substrat pada aktivitas enzim kitinase dari <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G pada pH 6 suhu 37°C.....	51
14	Elektroforegram hasil elektroforesis SDS-PAGE Silver Stain enzim kitinase dari bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G. (M) marker <i>Tris-Glycerin</i> (K) ekstrak kasar kitinase.....	52
15	Uji antagonis bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G.....	53
16	Uji antagonis enzim kitinase terhadap <i>Fusarium oxysporum</i>	54
17	Mekanisme kerja tipe siderofor dalam mengikat besi (Fe ³⁺).....	56
18	Uji produksi HCN.....	57
19	Kromatogram GC-MS bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> K4-G.....	58

DAFTAR ARTI SINGKATAN

SIMBOL/SINGKATAN	ARTI/KETERANGAN
VOC	Senyawa Organik Volatil
IAA	Indole Acetic Acid
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
APH	Agen Pengendali Hayati
Gac	Giberelin
OTP	Organisme Pengganggu Tanaman
GC-MS	Cromotography-Mass Spectrometry
UV-Vis	Ultra Violet-Visible
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignmnet Search Tool</i>
Fp	Faktor Pengenceran
NCBT	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	Ribosome Ribonucleic Acid
U	Unit
LAFC	<i>Laminar Air Flows Cabinets</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pestisida umumnya dibuat dari bahan kimia yang secara luas dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit seperti insektisida (Kaushal dkk., 2021), herbisida (Gonzalez dkk., 2021), fungisida (Berrie dan Xu., 2021) pada bidang pertanian. Data Direktorat pupuk dan pestisida tahun 2022, sebanyak 2.420 pestisida berbahan dasar aktif dan 1.890 *merk* dagangan yang digunakan dalam pertanian. Pemanfaatan pestisida secara terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan lingkungan seperti pencemaran air permukaan di daerah aliran sungai (Taylor dkk., 2021; Tan dkk., 2021) dan efek merugikan pada kesehatan manusia seperti gangguan kesehatan permanen pada anak-anak (Skrzypczak dkk., 2018). *World Health Organization* (WHO) melaporkan, sekitar 20.000 orang/tahun meninggal akibat keracunan pestisida, dan diperkirakan 5.000-10.000 orang/tahun mengalami dampak yang sangat fatal, seperti mengalami penyakit kanker, cacat tubuh, kemandulan dan penyakit liver, sehingga diperlukan penggunaan pestisida yang ramah lingkungan seperti biopestisida (Manan dkk., 2018).

Pestisida alami dibuat dengan inovasi teknologi yang memanfaatkan bahan alami seperti mikroba yang berfungsi sebagai biopestisida (Prihatiningsih dkk., 2018; Ferreira dkk., 2021; Bock dkk., 2021). Insektisida kimia (*Chloropyrifos* 480 EC, Karate EC dan Bandi 350 SK) paling efektif melawan hama sedangkan biopestisida (Eco-Bb, Bb endofit dan *Metarhizium rileyi*) dapat mengurangi pertumbuhan hama pada tanaman kapas (Malinga dan Laing., 2021). Biopestisida dapat diperoleh dari isolat bakteri endofit yang terdapat pada tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*).

Tumbuhan gembolo atau kentang udara (*Dioscorea bulbifera*) merupakan tanaman umbian yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat bagi masyarakat Cina dan India (Aries dkk., 2018). Gembolo memiliki kadar protein sebesar 10,46-10,77% (Singh dan Twinkle., 2022), dan kadar karbohidrat sebanyak 19,8%,

memiliki kadar air sebanyak 84,37% dan kadar abu sebanyak 0,82% (Winarti dkk., 2011), sehingga tanaman gembolo sering kali digunakan dalam bahan pembuatan tepung sebagai penstabil pada mie kering (Herlina dkk., 2015). Tumbuhan gembolo mengandung saponin 14,90%; flavonoid 9,94%; tanin 0,09%; alkaloid 0,94% (Singh dan Twinkle., 2022). Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman gembolo, melalui ekstrak kasar metanol mampu mencegah pertumbuhan mikroorganisme *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, yang menunjukkan aktivitas selektif dan daya hambat terhadap mikroorganisme uji (Kuate dkk., 2012). Umbi gembolo diduga memiliki bakteri endofit yang terdapat pada akar, berpotensi sebagai enzim kitinase dan agen biokontrol melalui proses isolasi bakteri endofit pada akar tanaman gembolo.

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang hidup saling menguntungkan dengan tanaman inangnya dan dapat menghasilkan senyawa aktif. Bakteri endofit dapat ditemukan pada jaringan tanaman seperti akar (Junior dkk., 2020; Lima dkk., 2018), daun (Lima dkk., 2018), batang (Pathak dkk., 2019) dan biji (marzouk dkk., 2021; Borrazzo dkk., 2020). Isolat bakteri endofit mampu memproduksi amonia pada tanaman yang ditandai dengan terdapat lingkaran kuning jingga dengan berbagai ukuran di sekitar pertumbuhan bakteri yang menunjukkan aktivitas siderofor untuk digunakan dalam penyerapan Fe (Pathak dkk., 2019), mampu memproduksi asam indol asetat (IAA) sebesar 60,273 g/mL pada tanaman tomat (Dey dan Raghuwanshi., 2020), mampu melarutkan fosfat pada media agar dengan efisiensi dalam melarutkan fosfat yaitu 35% pada tanaman (Dawwan dkk., 2013). Terdapat 36 strain bakteri endofit pada daun tanaman tomat yang dapat mengeluarkan senyawa organik volatil (VOC) sebagai aktivitas antijamur (Chauoachi dkk., 2020.) Hasil uji kultur bakteri endofit efektif mematikan nematoda *M. graminicola* pada tanaman padi sebesar 99,5%-100% dan 42-2%-49,3% pada percobaan rumah kaca (Munif dan Nurjayadi., 2021). Bakteri endofit dapat menghambat pembusukan dan layu pada tanaman yang disebabkan oleh mikroba antagonis (Kim., 2021).

Aktivitas mikroba antagonis yang teridentifikasi ditentukan terhadap bakteri patogen penyebab penyakit bercak daun (Kumar dkk., 2020). Mikroba antagonis yang telah banyak diteliti adalah *Bacillus subtilis* (Nabila dan Asri., 2021; Irfanti dkk., 2021; Syukur dkk., 2022), *Pseudomonas fluorescens* (Irfanti dkk., 2021; pathak dkk., 2019), dan *Trichoderma harzianum* (Tarigan dkk., 2017; Latifah dkk.,

2011; Ningsih dkk., 2016). Jamur antagonis mampu menjadi parasit bagi jamur patogen, dimana hifa jamur antagonis (*Trichoderma* spp.) menghasilkan haustoria yang menembus inang sehingga dapat melarutkan protoplasma dan menyusutkan hifa patogen sampai ke lisis (Kim dkk., 2021). Efek penghambat yang tinggi terhadap *Fusarium oxysporum* yaitu jamur *Gliocladium* dan isolat yang menunjukkan sebagai penghambat terhadap jamur patogen *Culvularia* sp. yaitu isolat jamur *Penicillium*, *Gliocladium* dan *Rhizopus* (Rusli dkk., 2021). *Pseudomonas fluorescens* sebanyak 36,08% dan *Trichoderma* spp. sebanyak 35% mampu menekan pertumbuhan *Colletotrichum* sp. Hidayah dkk., (2019) mengemukakan bahwa bakteri endofit *Metarhizium anispliae*, *Beauveria bassiana* dan *Streptomyces* sp. yang mengandung enzim kitinase dapat melindungi tumbuhan tebu yang diperlukan dalam pengendalian tanaman.

Enzim kitinase berperan penting dalam mendegradasi kitin menjadi N-asetil glukosamin dan aktivasi antijamur (Tabasum dkk., 2019). Terdapat beberapa enzim yang dapat memicu pertumbuhan tanaman seperti enzim fosfatase (Widawati dkk., 2010), enzim katalase (Pulungan dkk., 2018), enzim kutinase (Prasati dkk., 2013), enzim amilase (Prihatiningsih dkk., 2019) dan enzim kitinase (Hussin dkk., 2020). Produksi kitinase menjadi salah satu pemicu pertumbuhan tanaman karena mampu menginduksi lisis sel spesies bakteri tertentu (Brzezinska dkk., 2020). Hariprasad dkk (2011) mengemukakan bahwa isolat rizobakteri kitinolitik *B. subtilis* dapat memproduksi kitinase sehingga meningkatkan pertumbuhan tanaman tomat dan melindungi bibit tomat dari infeksi *Fusarium*. Kitinase yang berperan sebagai perlindungan tanaman dapat dijadikan sebagai peningkatan pertumbuhan pada tanaman atau PGPR.

Penambahan rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman (PGPR) dapat memberikan peran penting dalam ketersediaan nutrisi sehingga meningkatkan efisiensi tanaman dalam penambahan unsur hara organik. PGPR dapat mengatur pertumbuhan tanaman tanpa perpindahan mikroorganisme dengan tanaman. Ditemukan rizofor yaitu *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* dan *Lysinibacillus sphaericus* menunjukkan karakteristik PGPR (Pathak dkk., 2022).

Berdasarkan uraian pada latar belakang ini, maka dilakukan penelitian isolasi bakteri endofit dari tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*) penghasil enzim kitinase sebagai agen biokontrol.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bakteri endofit jenis apa yang dapat diisolasi dari akar tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*)?
2. Bagaimana aktivitas kitinase dari bakteri endofit pada tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*) pada kondisi optimum?
3. Aktivitas kitinase dari bakteri endofit dari tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*) yang berpotensi sebagai PGPR dalam agensia biokontrol secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari akar tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*).
2. Menentukan aktivitas kitinase dari bakteri endofit pada tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*) pada kondisi optimum.
3. Menguji aktivitas kitinase dari bakteri endofit tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*) yang berpotensi sebagai PGPR dalam agensia biokontrol secara in vitro.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat bakteri endofit dari akar tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*).
2. Memberikan informasi terkait bakteri endofit penghasil enzim kitinase dari akar tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*) pada kondisi optimum.
3. Memberikan informasi terkait bakteri endofit sebagai PGPR dalam agen biokontrol secara in vitro.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Gembolo (*Dioscorea bulbifera* L.)

Indonesia mempunyai jenis umbi-umbian yang beragam, namun belum dimanfaatkan secara optimal oleh masyarakat. Penanaman umbi masih cukup luas di pedesaan, terdapat lebih dari 600 spesies dari genus *Dioscorea* spp., antara lain *Dioscorea hispida* (gadung), *Dioscorea esculenta* (gembili), *Dioscorea alata* (umbi ungu), *Dioscorea opposita* (umbi putih), *Dioscorea villosa* (umbi kuning), *Dioscorea altissima*, *Dioscorea elephantipes*, dan *Dioscorea bulbifera* (gembolo) (Winarti dkk., 2011). Beberapa jenis tumbuhan *Dioscorea* sp. dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tumbuhan *Dioscorea* sp. (Tolangara., 2020)

Famili *Dioscorea* sp. secara tradisional telah dikenal sebagai salah satu sumber pangan oleh masyarakat Indonesia terutama di daerah Jawa, Sulawesi Utara, Nusa Tenggara, Maluku, Maluku Utara dan Papua sebagai pengganti beras atau sagu dimusim kondisi cuaca sedang tidak baik. Tumbuhan ini umumnya tidak dibudidayakan secara intensif dan biasanya hanya tumbuh melilit pada tanaman keras, tumbuhan ini juga biasanya mulai tumbuh pada musim hujan dan mulai dipanen pada musim kemarau, sebenarnya *Dioscorea* sp telah dibudidayakan oleh petani di Indonesia, namun karena nilai jual yang rendah dan diperparah karena munculnya desakan pangan modern serta belum tereksporasinya manfaat dari tanaman ini, sehingga kehadiran tanaman ini perlahan tersingkir (Tolangara.,

2020). Famili *Dioscorea sp* menjadi salah satu yang masih kurang optimum dalam pemanfaatannya saat ini adalah tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*).

Gembolo (*Dioscorea bulbifera* L.) merupakan tanaman umbi-umbian dari famili *Dioscoreaceae* yang banyak tumbuh Afrika dan Asia, salah satunya di Indonesia sebagai tanaman liar (Herlina dkk., 2015). Tanaman umbi gembolo digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati penyakit konjungtivitis, diare, disentri dan penyakit lainnya karena pada studi fitokimia tanaman ini mengandung struktural tujuh clerodane diterpenoid baru yaitu *Bafoudiosbulbins* (Kuete dkk., 2012). Umbi gembolo dapat dijadikan sebagai bahan pensubstitusi terigu pada pembuatan mie kering (Herlina dkk., 2015), dan sebagai karakteristik HFS (*High Fructose Syrup*) yang diproduksi secara hidrolisis enzimatis menggunakan amilase dan inulinase (Natori dkk., 2022). Bentuk dari tanaman gembolo dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tanaman Gembolo (*Dioscorea bulbifera*) (Tolangara., 2020)

Umbi gembolo (*Dioscorea bulbifera*) dalam bahasa Inggris disebut *aerial yam* yang memiliki keunikan yaitu umbi udara sehingga dikenal dengan nama kentang udara. Umbi gembolo memiliki batang halus dan tidak berduri, daun yang berbentuk sedikit bulat seperti jantung dan memiliki letak berseling dengan lebar daun mencapai 20-32 cm, menghasilkan bulbil berwarna coklat hingga ungu pada ketiak daun dan berbentuk ginjal dengan diameter 2,5 cm sampai 5 cm, memiliki umbi tunggal dan letaknya dekat permukaan tanah (dangkal) berbentuk bulat-pipih dengan ukuran 0,5-2 kg, warna abu-abu sampai coklat, dan bila dipotong akan teroksidasi berwarna orange, batang melilit ke kiri, biasanya tanpa bulu, panjang dapat mencapai 6 m, buah berwarna coklat cerah, ukuran 22 x 9 mm (Tolangara., 2020).

Umbi gembolo memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi yaitu 19,8% dan glukomanan sebagai kandungan utama polisakarida (Herlina dkk., 2015). Kadar

pati pada umbi gembolo mencapai 84,80% db dengan kadar amilosa 18,98% db dan amilopektin 65,82% db serta inulin 10,96% (Natori dkk., 2019). Kuete dkk (2012) melaporkan bahwa ekstrak kasar dari *Dioscorea bulbifera* sebagian besar dapat digunakan sebagai antimikroba yang potensial bagi manusia dalam mengobati berbagai penyakit akibat bakteri, Sehingga dapat diasumsikan bahwa tanaman umbi gembolo dapat pula sebagai antimikroba atau anti mikroorganisme pada tumbuhan yang dapat diisolasi dari akar tanaman umbi gembolo untuk memperoleh bakteri endofit melalui proses isolasi mikroorganisme.

2.2. Isolasi Mikroorganisme

Mikroorganisme yang terdapat pada suatu tempat atau lingkungan alami adalah populasi campuran dari berbagai jenis, baik mikroorganisme pada tanah, air, udara, makanan, maupun yang terdapat pada tubuh hewan maupun tumbuhan. Pemisahan mikroorganisme seperti bakteri yang diperlukan untuk mengetahui jenisnya, mempelajari kultural, morfologi, fisiologi dan karakteristik. Teknik pemisahan tersebut biasanya disebut isolasi yang disertai dengan pemurnian. Prinsipnya adalah memisahkan satu jenis mikroorganisme yang diinginkan dengan mikroorganisme lainnya yang berasal dari campuran bermacam-macam mikroorganisme (Sabbathini dkk., 2017).

Mengisolasi suatu mikroorganisme adalah memisahkan mikroorganisme tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Isolasi mikroorganisme harus diketahui cara-cara menanam dan menumbuhkan mikroorganisme pada medium perkembangbiakan. Mikroorganisme terdapat dalam populasi yang sangat besar, beragam dan terdapat di berbagai tempat di alam. Proses masuknya mikroorganisme ke dalam jaringan tumbuhan melalui bagian yang terluka pada tanaman, mencerna dinding sel dan menyerang melalui stomata (Ed-har dkk., 2017). Mikroorganisme terdapat paling banyak adalah tempat-tempat yang mengandung nutrient, kelembaban dan suhu yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Salah satu contoh setiap gram tinja terdiri atas bermilyar-milyar sel mikroba (Budi., 2017).

Mikroorganisme seperti bakteri dapat ditumbuhkan dalam media padat ataupun media cair. Pada media padat, sel-sel bakteri membentuk suatu koloni sel yang tetap pada tempatnya. Jika sel-sel tersebut terjatuh di media padat pada beberapa media yang terpisah, maka setiap sel atau kumpulan sel yang hidup akan berkembang menjadi satu koloni yang terpisah, sehingga memudahkan

proses pemisahan, sedangkan jika menggunakan media cair, sel-sel bakteri sulit dipisahkan secara individu karena terlalu kecil dan tidak tetap pada tempatnya. Ada beberapa metode untuk memperoleh biakan murni dari suatu biakan campuran yaitu metode cawan gores dan metode cawan tuang. Didasarkan pada prinsip pengenceran dengan maksud untuk memperoleh spesies individu, yaitu setiap koloni dapat terpisah dari suatu jenis sel yang dapat diamati (Sabbathini dkk., 2017).

Mikroorganisme sangat erat kaitannya dengan kehidupan manusia baik menguntungkan maupun yang merugikan. Sebagai sumber produk dan proses yang menguntungkan masyarakat misalnya alkohol yang dihasilkan melalui proses fermentasi dapat digunakan sebagai sumber energi. Mikroorganisme juga mempunyai potensi yang cukup besar untuk membersihkan lingkungan misalnya dari tumpukan minyak di lautan yang dipergunakan sebagai herbisida dan insektisida di bidang pertanian. Hal ini karena mikroorganisme mempunyai kemampuan untuk mendekomposisi atau menguraikan senyawa kimia kompleks. Kemampuan mikroorganisme yang telah direkayasa untuk tujuan tertentu menjadikan lahan baru dalam mikrobiologi industri yang dikenal dengan bioteknologi (Fifendy., 2017).

2.3. Bakteri Endofit

Bakteri endofit merupakan kandidat baik yang digunakan sebagai pupuk hayati dan agen biokontrol pada tanaman. Bakteri endofit menjelajah jaringan tanaman tanpa merugikan inangnya sehingga dapat mendorong pertumbuhan tanaman (Tahir dkk., 2019; Yang dkk., 2022). Strain bakteri endofit dapat menghambat pertumbuhan patogen tanaman yang diperoleh dari jamur fitopatogen yang dapat menyebabkan penyakit tanaman parah (Yang dkk., 2022).

Tanaman tingkat tinggi mengandung lebih dari satu jenis strain mikroorganisme endofit dengan kemampuan memproduksi metabolit bioaktif yang kemungkinannya diakibatkan oleh transfer genetik dari tanaman. Endofit yang hidup di dalam jaringan tanaman obat dapat berkontribusi atau bertanggung jawab atas sifat farmasi inangnya (misalnya, sifat antioksidan dan antimikroba) (Mamangkey dkk., 2022).

Bakteri endofit biasanya dapat ditemukan pada jaringan tanaman yang sehat seperti pada berbagai macam jaringan biji, akar, batang dan daun. Jaringan

internal pada bagian perakaran memiliki kerapatan populasi bakteri paling tinggi dibandingkan dengan bagian tanaman lain. Sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan fungi. Mikroba endofit dapat diisolasi dari benih, akar, batang, daun dan biji yang telah disteril (Susanti dkk., 2021).

Bakteri endofit tertentu dapat memproduksi senyawa kimia yang memiliki efek bagi kesehatan, terutama bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman obat (Liang dkk., 2019). Populasi bakteri endofit dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti, sifat tanah, bahan organik dalam tanah, teknik budidaya, pemupukan, dan aplikasi pestisida. Bakteri endofit diketahui sebagai agens hayati yang mampu mengendalikan nematoda secara efektif pada berbagai macam tanaman pertanian. Aplikasi isolat bakteri endofit mampu menurunkan jumlah puru akar secara signifikan terhadap infeksi *M. graminicola* pada tanaman padi pada percobaan rumah kaca dibandingkan dengan kontrol. Persentase penurunan jumlah puru akar oleh isolat bakteri endofit berkisar 42.7%–49.2% dan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara perlakuan isolat bakteri (Munif dan Nurjayadi., 2021).

Keberadaan bakteri endofit di dalam jaringan tanaman diketahui dapat memacu pertumbuhan tanaman dan berperan sebagai agen pengendali hayati. Bakteri endofit mempunyai banyak keuntungan dalam berbagai aspek kehidupan. Kemampuan bakteri untuk melakukan penetrasi ke jaringan internal tanaman dapat disebabkan oleh adanya enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Levy dkk., 2020). Setelah melakukan penetrasi, bakteri endofit akan berkolonisasi sehingga menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui mekanisme kompetisi ruang dan nutrisi (Ma dkk., 2022).

Fungsi bakteri endofit dalam bidang pertanian diantaranya sebagai pemacu pertumbuhan tanaman dan bioprotektan dari serangan hama dan penyakit tanaman (Pradana dkk., 2022). Bakteri endofit mampu menghambat nitrogen bebas yang ada di udara, melarutkan fosfat, dan memproduksi fitohormon. Selain itu, sebagai agens hayati bakteri endofit mampu menginduksi penghambatan mikroba patogen pada tanaman. Bakteri endofit juga dapat memodulasi senyawa metabolit sekunder dari tanaman inangnya. Literatur sebelumnya juga menyatakan bahwa bakteri endofit yang berasal dari famili *Solanum lycopersicum*, *Psidium guajava*, *Pinus merkusii*, *Dendrocalamus asper*, *Albizia chinensis*, dan *Theobroma cacao* L dapat memproduksi senyawa metabolit

sekunder yang berpotensi sebagai antibakteri (Lahl dkk., 2012).

Bakteri endofit kemungkinan mampu menghasilkan senyawa antibakteri namun dalam jumlah yang sedikit atau menghasilkan senyawa aktif lain yang belum diketahui. Terbentuknya zona bening menandakan bahwa bakteri endofit tersebut memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa ekstraseluler yang bersifat antibakteri. Perbedaan diameter zona bening yang terbentuk kemungkinan disebabkan perbedaan jenis senyawa antibakteri yang dihasilkan tiap isolat bakteri endofit (Husain dkk., 2022). Mikroba endofit yang diisolasi dari tumbuhan yang menghasilkan bahan bioaktif diketahui memiliki aktivitas yang sama bahkan dapat memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas tumbuhan inangnya. Hal ini sangat efisien dan menguntungkan karena siklus hidup mikroba endofit lebih singkat dan mudah dikultur dibandingkan siklus hidup inangnya (Susanti dkk., 2021).

Purwanto dkk., (2014) melaporkan bahwa bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*P. betle* L.) telah berhasil dilakukan dan diperoleh 14 isolat murni. Uji penapisan isolat bakteri endofit terhadap 4 jenis bakteri patogen menunjukkan bahwa terdapat 3 isolat yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber antibakteri baru, khususnya terhadap *S.aureus*. Valentina dkk (2018) mengemukakan bahwa diperoleh isolat bakteri dari akar tanaman ubi jalar varietas Papua Patippi yang dapat menghasilkan hormon IAA, sedangkan pada penelitian Ummah dkk., (2019) terdapat lima bakteri isolat pada akar tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum*) yang mampu mereduksi nitrat yang berpotensi sebagai penambat nitrogen. Sulis (2020) juga melaporkan bahwa bakteri endofit dapat digunakan sebagai pengendali penyakit layu tanaman bakteri *R. Solanacearum*.

Bakteri endofit sering kali ditemukan pada genus *Pseudomonas*, *Bacillus* dan *Staphylococcus*. Berikut merupakan morfologi dari setiap genus pada bakteri endofit:

1. Genus *Pseudomonas*

Pseudomonas sp. merupakan bakteri yang berupa sel berbentuk batang lurus dan mempunyai motil dengan flagellum polar, memiliki koloni berbentuk bulat dan berwarna putih-krem kekuningan, bakteri dengan gram negatif. Bakteri ini tidak berspora dan tidak memiliki selubung dan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 42°C (Wirarni., 2013). Genus ini memiliki bentuk tepian tidak rata, dengan panjang sekitar 1,5-5,0 µm dan lebar 0,5-1,0 µm. Genus *Pseudomonas* mampu menghidrolisis pati dan ditemukan di dalam tanah dan air menggunakan

berbagai sumber karbon (Santoso dkk., 2019). *Pseudomonas* memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase, sirase dan urease dengan kemampuan hidupnya rentang pada pH antara 4-11, sehingga termasuk bakteri anaerob (Marista dkk., 2013).

2. Genus *Bacillus*

Genus *Bacillus* merupakan bakteri aerob dan anaerob fakultatif yang menggunakan oksigen sebagai penerima elektron pada rantai respirasi selnya (Marista dkk., 2013). Genus ini berwarna putih susu, berbentuk koloni keseluruhan bulat dan tepian yang keriput. Memiliki bentuk sel batang dan lurus dengan ukuran 0,5-2,5 μm x 1,2-10 μm , memiliki gram positif (Napitupulu dkk., 2019), memiliki endospora sehingga anggota genus *Bacillus* memiliki toleransi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang berubah-ubah. *Bacillus* memiliki kemampuan dalam mereduksi nitrat, menghidrolisis pati dan gelatin, dan memproduksi β -galaktosidase, memiliki pertumbuhan pada suhu 37°C, memiliki aktivitas oksidasi yang beragam dan bersifat motil (Puspita dkk., 2017).

3. Genus *Staphylococcus*

Genus *Staphylococcus* memiliki bentuk koloni circular (bulat), berwarna putih, tepian rata dan bergelombang, elevasi convex (cembung), bentuk sel bulat dan motil, berbentuk tidak beraturan berkelompok dan bergerombol seperti anggur (Fani dkk., 2022). Genus ini juga memiliki gram positif, katalase positif dan oksidase negatif, sering mengubah nitrat menjadi nitrit, mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa, tumbuh optimal pada temperatur 37°C (Yulvizar., 2013), berukuran 0,8-1,0 μm dan bersifat anaerob fakultatif (Andika dan Sulistyarsi., 2017).

4. Genus *Enterobacter*

Enterobacter sp. adalah genus bakteri berbentuk basil gram negatif, yang cenderung lebih kecil dan irreguler, tebal 0,5-1,5 μm , memiliki banyak flagella dan termasuk bakteri motil, suhu optimum untuk pertumbuhan genus ini adalah 30 °C namun Sebagian besar tumbuh pada suhu 37 °C, bakteri dengan genus *Enterobacter* memiliki hasil positif dalam pemeriksaan sitrat, motil dan memproduksi gas dari glukosa (Nursyam dan Prihanto., 2018).

2.4. Mikroba Antagonis

Mikroba antagonis atau agen pengendali hayati (APH) adalah mikroorganisme yang diperoleh dari alam, baik berupa bakteri, cendawan, *actinomycetes* maupun virus yang dapat menekan, menghambat atau memusnahkan organisme pengganggu pada tanaman (Hanudin dan Marwoto., 2012). Bakteri antagonis dalam aktivitas organisme yang satu dengan organisme yang lainnya akan melakukan persaingan dalam memperebutkan tempat, udara, air, bahan makanan (nutrien), jika bakteri tersebut tidak saling bersaing akan tetapi bakteri tersebut berinteraksi dan bersinergi, serta berbagi sumber nutrisi yang sama dan berperilaku kooperatif antar bakteri dalam habitatnya maka dapat dikatakan sinergisme (Rifai dkk., 2020).

Mikroba yang berpotensi sebagai mikroba antagonis ada yang mampu menghasilkan senyawa kelompok lipopeptida yang berpotensi sebagai antifungi dan antibakteri terhadap patogen tanaman (Ariyanti dkk., 2021). Penggunaan dua macam antagonis terbukti mempunyai kemampuan lebih baik dibandingkan hanya menggunakan satu macam dalam menentukan laju perkembangan penyakit. Penggunaan lebih dari satu mikroorganisme antagonis terutama yang mempunyai mekanisme pengendalian berbeda agar mampu meningkatkan efektivitas pengendalian terhadap penyakit tanaman (Budi dkk., 2022). Bakteri antagonis dapat menginduksi resistensi tanaman terhadap patogen dengan cara mengaktifkan lintasan sinyal dan melibatkan hormon asam jasmoik dan etilen tanaman. Ketahanan tanaman dapat diinduksi oleh mikroba maupun senyawa kimia yang ditunjukkan oleh peningkatan kandungan senyawa tertentu, seperti enzim β -1,3. glukanasase, kitinase, β -1, glukosidase, kitonase, peroksidase, fenol dan asam salisilat (Djaenuddin., 2016). Senyawa kimia ini dapat mengendalikan penyakit tanaman yang disebabkan oleh beberapa bakteri.

Penyakit tanaman yang sering kali ditemukan yaitu penyakit layu yang disebabkan oleh *Fusarium* sp. (Kumalasari dkk., 2021), *Trichoderma harzianum* pada penyakit bercak daun (Budi dkk., 2022), bakteri *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu pada tanaman jahe (Bustaman., 2006), penyakit karat putih (*Puccinia horiana*) dengan bakteri *P. Fluorescens* pada tanaman krisan (Lala dan Tulung., 2019), dan penyakit layu terong disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* (Joshi dkk., 2021).

Uji antagonis yang diperlukan untuk melihat adanya interaksi antar mikroorganisme yang meliputi berkolonisasi, beradaptasi di lingkungan dan

mendapatkan nutrisi (Noor dkk., 2021). Metode *cross steak* dapat dilakukan untuk menentukan antagonis diantara isolat bakteri, adanya interaksi antagonis menunjukkan bahwa mereka bersifat saling mengalahkan, isolat bakteri dapat bersifat antagonis satu sama lain disebabkan oleh beberapa faktor yaitu kompetisi nutrisi dan pembentukan antibakteri, perubahan pH, perubahan potensial redoks, pembentukan zat antimikroba dan bakteriofag (Setyati dkk., 2016). Hal ini dapat dilihat dari perbedaan kemampuan daya hambat pada setiap isolat disebabkan oleh perbedaan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh masing-masing isolat yang telah berdifusi terlebih dahulu. Flori dkk., (2020) melaporkan bahwa hasil uji antagonis semua isolat bakteri anggota spesies *Bacillus* sp. mampu menekan pertumbuhan jamur anggota *Fusarium* sp. Kondisi ini menunjukkan bahwa bakteri anggota spesies *Bacillus* memiliki kemampuan sebagai agen antagonis bagi jamur patogen melalui kemampuannya menghasilkan beberapa senyawa penghambat tumbuhan.

Hasil isolasi mikroba rizofe dan pengujian daya antagonis hasil isolasi dari tumbuhan jahe dapat dilihat pada Tabel 1 (Bustaman., 2016).

Tabel 1. Hasil Isolasi Mikroba Rhizosfer dan Pengujian Daya Antagonisnya dari Tumbuhan Jahe

Mikroba rizosfer	Kelompok	Daya Antagonis	Potensi
<i>Aspergillus nidulans</i>	jamur	++	Baik
<i>Gliricium virens</i>	jamur	+++	Sangat baik
<i>Paecilomyces roseaus</i>	jamur	-	netral
<i>Pennicilium digitatum</i>	jamur	+++	Sangat baik
<i>Rhizopus oryzae</i>	jamur	+	Baik
<i>Saccharomyces</i> sp.	jamur	-	Baik
<i>Trichoderma harzium</i>	jamur	+++	Sangat baik
<i>Trichoderma koningii</i>	jamur	+	Baik
<i>Trichoderma viride</i>	jamur	+++	Sangat baik
<i>Achromobacter</i> sp.	bakteri	+++	Sangat baik
<i>zotobacter</i> sp.	Bakteri	-	Netral
<i>Bacillus</i> sp.	bakteri	+	Baik
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakteri	+++	Sangat baik
<i>Pseudomonas putida</i>	Bakteri	+	Baik

Hanudin dan Marwoto (2012) melaporkan bahwa penggunaan mikroba antagonis untuk mengendalikan organisme pengganggu tanaman mempunyai beberapa keunggulan, yaitu sebagai berikut:

1. Tidak berdampak negatif terhadap lingkungan
2. Aman bagi musuh alami organisme pengganggu tanaman tertentu
3. Mencegah timbulnya ledakan organisme pengganggu tertentu sekunder
4. Menghasilkan produk yang bebas residu senyawa kimiawi sintesis
5. Aman bagi kesehatan manusia
6. Terdapat di sekitar pertumbuhan sehingga mencegah ketergantungan petani pada pestisida kimiawi sintesis
7. Dapat menurunkan biaya produksi

Sedangkan kelemahannya yaitu reaksi kemampuan mikroba antagonis terhadap organisme pengganggu tanaman dengan sasaran yang lebih lambat dan daya simpan lebih singkat dibandingkan dengan pestisida kimiawi sintesis.

2.5. Bakteri Kitinolitik

Mikroorganisme kitinolitik adalah mikroorganisme yang memiliki aktivitas kitinolitik yang dapat mendegradasi kitin menggunakan enzim kitinase yang dihasilkan pada proses isolasi dengan berbagai sumber lingkungan tanah, laut, danau, kolam, dan tumbuhan untuk asimilasi kitin yang dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan nitrogen bagi bakteri itu sendiri (Hutauruk., 2018). Kehadiran mikroorganisme kitinolitik di tanah terutama pada *rhizoplane* dan filoplen tanaman dapat melindungi tanaman dari infeksi jamur, kitin yang terdapat pada dinding sel jamur patogen mampu dilisiskan oleh mikroorganisme kitinolitik sehingga mengurangi terjadinya infeksi penyakit tanaman (jaya dkk., 2022).

Aktivitas mikroorganisme pada tanaman paling kaya di temukan pada bagian perakaran tanaman atau rizosfer. Tingginya aktivitas ini disebabkan oleh nutrisi yang terkandung pada bagian akar sangat kompleks, diantaranya sebagai sumber karbon dan nitrogen yang diperoleh dalam bentuk asam amino dan gula, untuk perkembangan mikroorganisme sehingga disebut sebagai bakteri jaringan internal akar yang merupakan bagian yang memiliki kerapatan bakteri endofit kitinolitik paling tinggi pada bagian internal akar. Indikator untuk mengetahui agen antagonis melalui karakterisasi fisiologi dengan kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim ekstraseluler (protease, selulase dan kitinase) (Harni., 2010).

Mikroorganisme dapat tumbuh berdasarkan suhu lingkungan tempat tumbuh atau berkembang biaknya yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu *psikofil*, *mesofil*, *termofil*, dan *hipertermofil*. *Psikofil* merupakan suatu kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 0-25 °C. *Mesofil* merupakan kelompok mikroba yang dapat tumbuh dengan tumbuh pada suhu 20- 50 °C. Mikroba *termofil* merupakan kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu sekitar 45-80 °C dan *hipertermofil* merupakan mikroba yang dapat tumbuh pada suhu sekitar 80-100 °C (Sholihati dkk., 2015), beberapa bakteri dapat menghasilkan kitinase bila ditempatkan di lingkungan yang terdapat kitin.

Bakteri kitinolitik dapat menghasilkan enzim kitinase, karena enzim kitinase disintesis secara induktif, yaitu hanya akan dihasilkan jika ada senyawa kitin sebagai industernya. Hasil degradasi kitin yang diperoleh dapat digunakan sebagai sumber nutrisi bagi bakteri, sehingga bakteri tumbuh lebih cepat menutupi zona bening dan pembelahan sel berlangsung dengan cepat dan jumlah sel bertambah banyak yang menyebabkan konsentrasi enzim akan meningkat dan aktivitas enzim semakin besar (Niken dkk., 2013). Mekanisme bakteri kitinolitik dalam menghambat pertumbuhan jamur yaitu bakteri akan menghasilkan enzim kitinase dan merusak komponen struktural jamur yaitu dinding selnya. Kerusakan dinding sel tersebut akan mempengaruhi permeabilitas membran sel jamur, menyebabkan sistem transpor zat antar sel jamur menjadi terganggu, sehingga dapat menghambat pertumbuhan jamur (Prasetya dkk., 2018).

Bakteri kitinolitik yang dapat menghasilkan kitinase yang dikenal dengan genus *Aeromonas*, *Serratia*, *Cromobacterium*, *Pseudomonas*, *Ewingella*, *Vibrio*, *Streptomyces*, dan *Bacillus* (Syahfitri dkk., 2018). Hariprasad dkk., (2021) melaporkan bahwa bakteri kitinolitik dapat diisolasi dari tanah yang digunakan sebagai pengendali layu *Fusarium* pada tanaman tomat. Bakteri kitinolitik dapat diisolasi dari Himalaya India Barat Laut yang menghasilkan genus *Paenibacillus* (Avupati dkk., 2017).

2.6. Enzim Kitinase

Reaksi atau proses kimia yang berlangsung dengan baik dimungkinkan karena adanya katalis yang disebut enzim. Tahun 1837, ilmu pengetahuan tentang katalis telah ditemukan oleh Berzelius, ia mengusulkan nama “katalis” untuk zat-zat yang dapat mempercepat reaksi tetapi zat tersebut tidak ikut bereaksi. Tahun

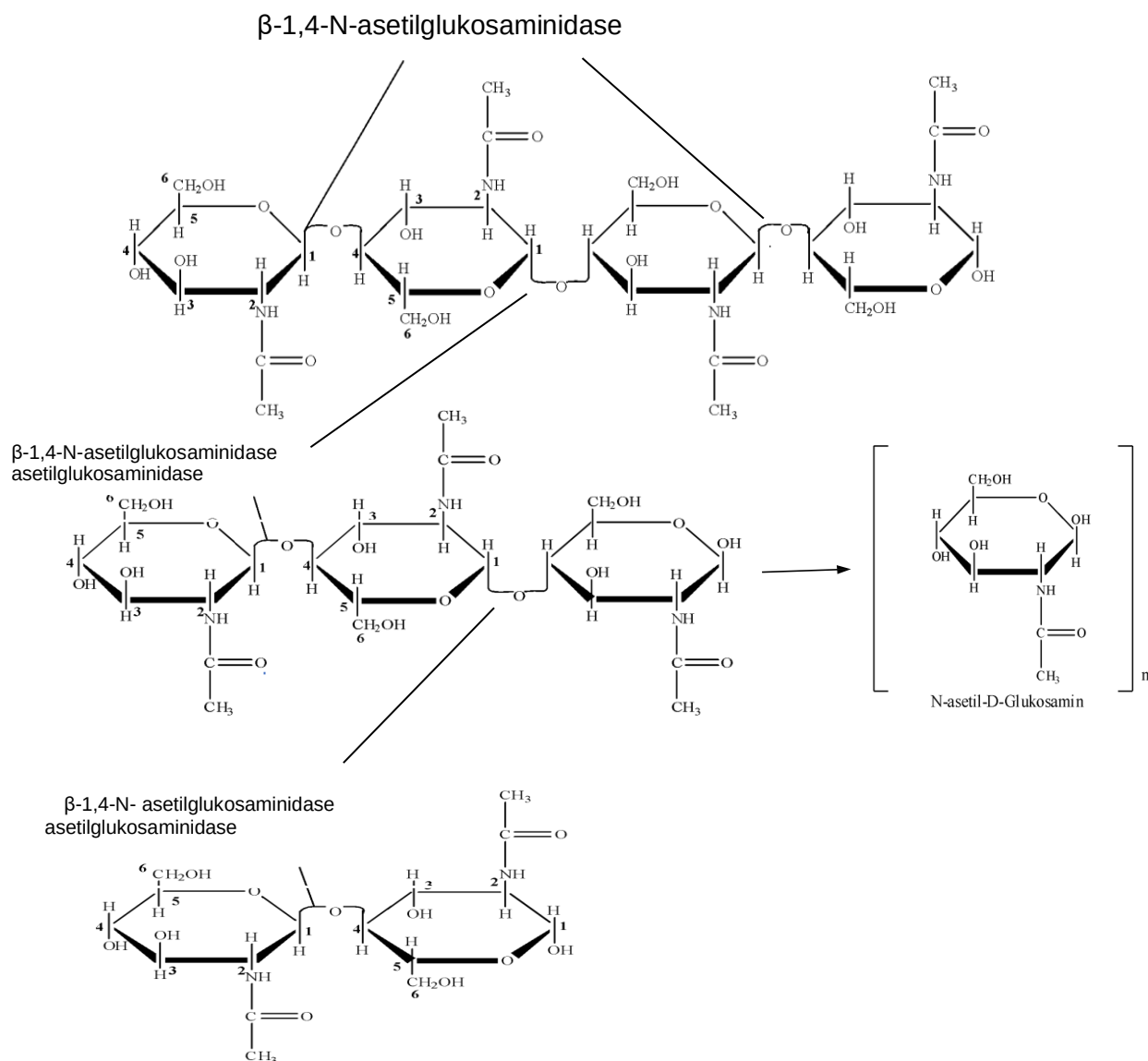
1926, enzim dikenal pertama kali sebagai protein oleh Sumner, yang telah berhasil mengisolasi urease dari “kara pedang”. Sejak tahun 1926, ilmu pengetahuan tentang enzim berlangsung dengan cepat (Poedjiaji dan Titin., 1994). Enzim merupakan salah satu penyusun dari protein yang berfungsi sebagai katalis pada reaksi-reaksi kimia, dengan adanya enzim sebagai katalisator dapat mempercepat terjadinya reaksi dibandingkan tidak menggunakan katalis (Supriyatna., 2015). Salah satu enzim yang berperan dalam kehidupan yaitu kitinase.

Kitinase adalah enzim golongan glikosil hidrolase yang mengkonversi kitin menjadi monomernya yakni N-asetil glukosamin yang dapat digunakan sebagai substrat dalam berbagai aplikasi industri (Rustam, 2022). Kitinase tersedia melimpah di alam (kedua setelah selulase) dan bisa diperoleh dari berbagai mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Kitinase dapat digunakan sebagai biopestisida yang aman dan ramah lingkungan, peranan kitinase dalam bidang pertanian yaitu sebagai agen pengendali hayati untuk mengendalikan organisme pengganggu tumbuhan seperti jamur maupun serangga hama (Suryadi dkk., 2020).

Enzim kitinase mampu menghidrolisis kitin yang merupakan komponen utama penyusun cendawan, kitinase menghidrolisis kitin dengan memutuskan ikatan β -1,4 homopolimer N-asetilglukosamin menjadi monomer N-asetilglukosamin. Kitinase dapat dikelompokkan menjadi 3 bagian yaitu endokitinase, eksokitinase dan N-asetil-glukosaminidase. Endokitinase dapat menghidrolisis kitin secara acak dari bagian dalam menghasilkan kitooligomer (dimer, trimer, tetramer dan oligomer gula), sedangkan eksokitinase menghidrolisis kitin secara berurutan dari ujung non reduksi, dan N-asetil-glukosaminidase yang memutuskan diasetil kitobiosa untuk menghasilkan N-asetil-glukosamin (Pratiwi., 2015).

Kitin merupakan suatu polisakarida struktural yang mengandung nitrogen dan bergabung dengan protein sebagai bahan dasar pembentuk rangka luar. Kitin memiliki kandungan nitrogen sebesar 6,98% sehingga dapat digunakan sebagai agen pengkelat. Kitin pada rantai polimer N-asetil-glukosamin memiliki ikatan hidrogen antara gugus NH dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan sehingga membentuk mikrofibril, memiliki struktur yang rigid. Struktur kitin sama dengan selulosa dimana ikatan yang terjadi antara monomernya terangkai dengan ikatan glikosida pada posisi β -(1-4). Perbedaan antara kitin dengan selulosa adalah gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua

digantikan oleh gugus asetamida (NHCOCH_3) sehingga kitin menjadi polimer berunit N-asetilglukosamin (Corneliyawati dkk., 2018). Reaksi pemutusan kitin dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi pemutusan diasetil kitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc [8,9,10] (Pratiwi dkk., 2015)

Hidayah dkk., (2019) melaporkan bahwa penggunaan agensia hayati dalam melindungi tumbuhan tebu pada hama penyakit tanaman menggunakan *Metarhizium anispliae*, *Beauberia bassiana* dan *Streptomyces* sp. yang mengandung enzim kitinase diperlukan dalam pengendalian tanaman karena dapat merusak dinding jamur. Selain itu, Nurmalinda dkk., (2020) melakukan penelitian dengan menggunakan enzim kitinase sebagai penghambat

pertumbuhan cendawan patogen tanaman cabai. Beberapa hasil penelitian terkait produksi kitinase oleh mikroorganisme dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2.Hasil Penelitian Terkait Produksi Kitinase Oleh Berbagai Mikroorganisme

Nama Mikroba	Sumber Isolat	Aplikasi	Referensi
<i>Streptomyces</i> dan <i>Pseudomonas</i>	Akar	Biokontrol	Bruzos dkk 2021
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Biokontrol	Rostami dkk 2017
<i>Tricoderma harzianum</i>	Bubuk kulit udang	Biokontrol	Mondejar dkk 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	Rizosfer gandum	Antijamur	Brzezinska dkk 2020
<i>Chitinophilus shinnonensis</i>	Air parit	antijamur	Huang dkk 2011
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>x. nematophilus</i>	biokontrol	Mahmood dkk 2020
<i>Bacillus subtilis</i>	Tanah rizosfer tomat	Antijamur	Hariprasad dkk 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	Usus <i>Globitermes sulphureus</i>	biotermisida	Hussin dkk 2020
<i>Paenibacillus</i>	tanah	Bioefikasi	Avupati dkk 2017
<i>Trichoderma</i>	tanah	Antijamur	Karim dkk 2020

2.7. Pertumbuhan Tanaman Mempromosikan Rizobakteri (PGPR) Sebagai Biokontrol

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) adalah produk yang terdiri dari strain bakteri yang bermanfaat untuk ketersediaan nutrisi tanaman, termasuk carrier dengan masa penyimpanan pada waktu yang ditentukan (Hidayat dkk., 2022). PGPR berperan penting dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman, hasil panen dan kesuburan lahan yang dapat merangsang pertumbuhan tanaman dengan menghasilkan hormon pertumbuhan, vitamin dan berbagai asam organik serta meningkatkan asupan nutrisi bagi tanaman seperti memiliki kemampuan

melarutkan fosfat dan *Indole Acetic Acid* (IAA) bagi tanaman (Yanti dkk., 2021), melarutkan kalium yang tidak larut dalam tanah dan memproduksi fitohormon untuk mendukung pertumbuhan tanaman (Mulan dari dkk., 2021).

PGPR berfungsi dalam mempercepat unsur hara melalui akar tanaman, sehingga dengan pemberian PGPR yang tepat dapat memenuhi kebutuhan unsur hara makro dan mikro dalam memacu pertumbuhan vegetatif yang mampu meningkatkan hormon-hormon pertumbuhan yang dihasilkan seperti *Giberelin* (Gac), dapat mensintesis dan mengubah konsentrasi berbagai fitohormon pertumbuhan dan untuk menekan aktivitas patogen dengan menghasilkan berbagai senyawa atau metabolit seperti antibiotik (Ningsih dan Aini., 2021). Satu strain PGPR dapat memiliki kemampuan lebih dari satu kategori fungsi, sehingga fungsi perangsang tumbuhan dan penyedia hara merupakan fungsi langsung dari PGPR, sedangkan fungsi pengendali patogen merupakan fungsi tidak langsung dari PGPR itu sendiri yang menjadi satu kesatuan yang tidak dapat dipisahkan (Marsuni dan Ahmad., 2021).

Mukayis dan Yulianti (2021) mengemukakan bahwa perendaman benih bayam dengan PGPR menunjukkan daya berkecambah yang lebih tinggi daripada kontrol dan meningkatkan daya tahan bibit terhadap serangan penyakit. Setyawan dkk (2022) dalam penelitiannya memanfaatkan ekstrak akar bambu sebagai PGPR pada tanaman kacang bambara sebagai pemicu pertumbuhan. Hal ini juga didukung oleh penelitian Susmita dkk 2022 menggunakan PGPR akar bambu sebagai pertumbuhan bibit tebu. PGPR mempertahankan diri dari proses inokulasi ke dalam benih, penggandaan diri dalam spermosfer terhadap eksudat benih, penyerangan terhadap pertumbuhan akar dan berkolonisasi mendiami daerah perakaran untuk memperkuat sistem akar (Khasanah dkk., 2020). Bakteri PGPR dapat memberi keuntungan dalam proses fisiologi tanaman dan pertumbuhannya (Ristiana dkk., 2022).

Pestisida sintetis menjadi salah satu pengendali hama pengganggu tanaman yang menunjukkan penurunan efektifitas dan residu yang ditinggalkan dari pestisida sintetis yang tidak ramah lingkungan (Hasfita dkk., 2013). Pestisida dibagi menjadi tiga macam yaitu pestisida kimia sintesis, pestisida organik dan pestisida semi organik. Pestisida kimia terbuat dari bahan-bahan kimia, pestisida organik terbuat dari bahan-bahan organik dari tumbuhan, hewan maupun organisme lainnya, sedangkan pestisida semi organik terbuat dari gabungan dan perpaduan antara pestisida kimia dan pestisida organik (Ula dan Mizani., 2022).

Ketergantungan terhadap penggunaan pestisida kimia mengakibatkan pengembangan metode-metode lain untuk mengendalikan hama dan penyakit sehingga diperlukan pestisida dengan bahan ramah lingkungan atau sering disebut biopestisida.

Biopestisida dapat digunakan sebagai cara pengendalian hayati yang ramah lingkungan dan prospektif dikembangkan untuk mengurangi penggunaan fungisida kimia yang semakin mahal, dalam pengendalian ini digunakan berbagai jenis mikroba yang bersifat antagonis terhadap patogen yang telah ada di lingkungan habitat tanaman sehingga dapat dieksplorasi (Antastia dkk., 2019). Biopestisida dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan asalnya yaitu pestisida nabati dan hayati. Biopestisida nabati terbuat dari ekstraksi pada bagian tertentu dari suatu tanaman seperti biji, daun, akar atau bahkan buahnya yang memiliki sifat toksik terhadap hama dan penyakit tertentu, sedangkan biopestisida hayati terbuat dari formulasi mikroba tertentu seperti bakteri, jamur atau bahkan virus yang bersifat antagonis pada penyebab penyakit tertentu (Aprilianti dan Mulyawan., 2021). Biopestisida yang berasal dari bakteri memerlukan beberapa parameter yang digunakan sebagai biokontrol dalam *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) adalah sebagai berikut:

1. Hormon Siderofor

Siderofor merupakan senyawa organik yang dihasilkan oleh *plant growth promoting rhizobacteria* dan dapat digunakan dalam pengendalian penyakit tanaman. Mekanisme bakteri penghasil siderofor dalam cara kompetisi dengan mengikat Fe^{3+} yang merupakan pesaing terhadap mikroorganisme. Keuntungan lain yang diperoleh dari bakteri penghasil siderofor dapat menghasilkan antibiotik. Senyawa antibiotik ini dapat menghambat pertumbuhan patogen pada saat kontak langsung dengan perakaran tanaman (Yulianda dkk., 2021). Siderofor dikategorikan sebagai katekolat, hidroksamat atau α -hidroksikarboksilat berdasarkan gugus fungsinya yang membedakan ligan dengan ferric (Fe^{3+}).

Siderofor tipe karboksilat adalah kelas siderofor unik yang mengandung senyawa hidroksil dan karboksil, spesies bakteri seperti *Staphylococci*, *Rhizobium meliloti* dan *Mucorals* masing-masing merupakan sumber siderofor *rhizoferrin* karboksilat. Mikobaktin adalah siderofor turunan lisin yang mengandung senyawa 2-hidroksi fenil oksazolin yang memulihkan zat besi. Siderofor mikobaktin diproduksi oleh *Mycobacteria*, spesies bakteri disebut mikobaktin, yang terdiri dari dua hidroksamat, satu fenolat, dan satu lagi nitrogen oksazolin. *Pyoverdine*

merupakan senyawa dihydroxyquinoline, dan secara struktural setiap *pyoverdine*. Siderofor *anguibactin* adalah siderofor ligan campuran turunan histamin. Siderofor *anguibactin* dapat digunakan dalam sel hidup sebagai penginduksi penyerapan zat besi (Singh dkk., 2022).

2. Hidrogen sianida (HCN)

Hidrogen sianida adalah metabolit sekunder yang mudah menguap yang disintesis oleh banyak rizobakteri dan memiliki efek kuat pada banyak organisme. HCN menghambat transpor elektron dan mengganggu suplai energi ke sel, yang menyebabkan kematian organisme hidup. Beberapa bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan HCN diantaranya spesies *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Rhizobium* (El-Rahman dkk., 2019). HCN bekerja dengan cara menghambat kerja enzim yang memiliki kofaktor berupa ion logam seperti Cu^{2+} pada sitokrom C oksidase (Safriani dkk., 2020).

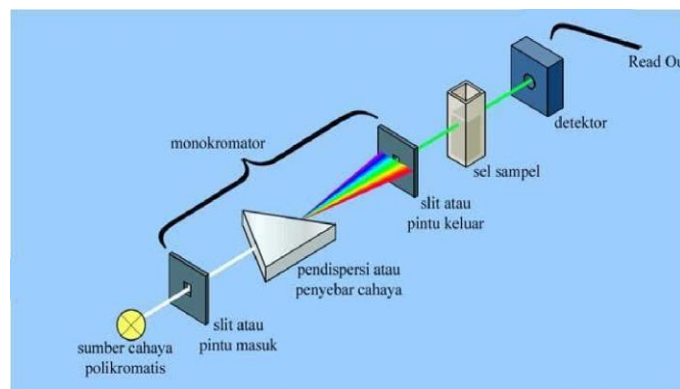
3. Hormon IAA (*Indole Acetic Acid*)

Hormon IAA (*Indole Acetic-Acid*) merupakan fitohormon auksin alami yang berperan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman karena mampu meregulasi proses fisiologi penting yang meliputi pembelahan dan perkembangan sel, diferensiasi dan sintesis protein (Ardiana dan Advinda., 2022). Produksi hormon IAA yang fluktuatif berkaitan erat dengan kebutuhan dasar dari bakteri endofit. Bakteri endofit mampu merombak kembali hormon IAA yang telah dihasilkan, apabila kebutuhan nutrisi dalam media berkurang, hasil dari perombakan ini selanjutnya dimanfaatkan kembali oleh bakteri endofit untuk melakukan sintesis protein dan kegiatan fisiologis dalam sel (Hidayatullah dkk., 2017).

Keberadaan mikroorganisme dalam PGPR memberikan keuntungan terhadap pertumbuhan tanaman salah satunya yaitu proses fisiologi tanaman dan sebagai perangsang tumbuhan bagi tanaman, penggunaan PGPR dalam usaha pertanian dan digunakan sebagai pupuk hayati yang dapat memberikan sumber bioteknologi dan budidaya tanaman untuk meningkatkan produktivitas suatu tanaman (Kusumaningtyas dkk., 2017). PGPR untuk meningkatkan produksi pangan tidak lepas dari ranah sebagai media tumbuh tanaman, tanah dipenuhi dengan kehidupan mikroskopis seperti bakteri, jamur, *actinomyces*, protozoa dan algae, bakteri ini ada yang merugikan dan ada pula yang bermanfaat bagi tanaman, kelompok PGPR hidup di sekitar perakaran dengan membentuk koloni menyelimuti permukaan akar, sehingga energi pertumbuhannya diperoleh dengan memanfaatkan akar (Ekawati., 2019).

2.8. Spektrofotometer UV-Visible

Spektrofotometer merupakan salah satu alat untuk mempelajari interaksi sinar elektromagnetik dengan materi. Gelombang elektromagnetik yang digunakan berkisar 180-800 nm. Energi elektromagnetik akan diubah menjadi suatu besaran listrik dan melalui amplifier yang akan diubah menjadi besaran yang akan diamati. Radiasi elektromagnetik adalah energi yang digunakan untuk penyerapan dan emisi radiasi magnetik yang akan diteruskan melalui ruang dengan kecepatan luar biasa. Berbagai bentuk radiasi elektromagnetik dan paling mudah dilihat adalah cahaya atau sinar tampak. Contoh lain dari radiasi elektromagnetik adalah radiasi sinar gamma, sinar X, ultraviolet, inframerah, gelombang mikro dan gelombang radio (Bintang, 2010). Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4. Prinsip Kerja Spektrofotometer UV-Vis (Azizah, 2017)

Spektrofotometer selain merupakan suatu alat pengukuran kualitatif juga merupakan alat pengukuran kuantitatif karena jumlah sinar yang diserap oleh partikel di dalam larutan juga tergantung pada jenis dan jumlah partikelnya. Prinsip penggunaan spektrofotometer adalah berdasarkan hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa setiap lapisan dengan ketebalan yang sama dari energi radiasi yang melewatinya. Fraksi energi radiasi yang dipancarkan oleh medium penyerap dengan ketebalan tertentu tidak bergantung pada intensitas radiasi yang datang dengan syarat radiasi tersebut tidak merusak secara fisik maupun dengan kimia terhadap medium (Bintang, 2010). Pada prinsipnya spektrofotometer UV-Vis merupakan alat untuk mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul dalam larutan. Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya pada

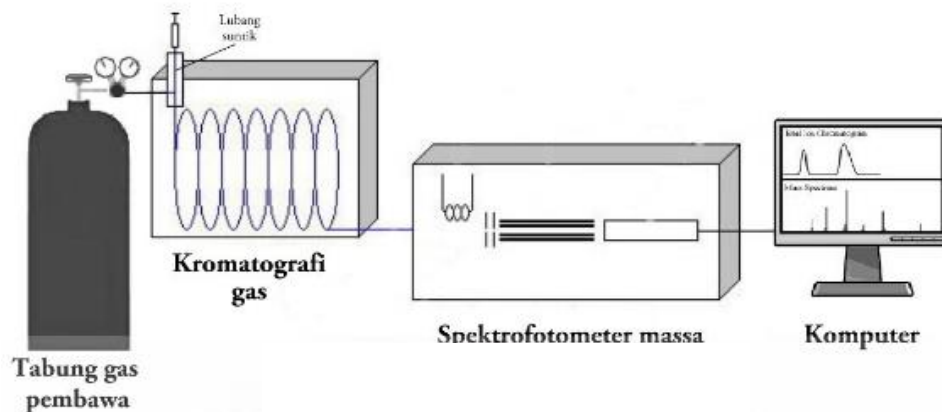
panjang gelombang tertentu yang dikenal dengan absorbansi (A), setara dengan konsentrasi larutan tersebut (Rusli., 2009).

Spektrofotometer ultra-violet dan sinar tampak atau yang biasa disebut dengan UV-Vis dapat digunakan dalam analisis kimia untuk analisis kualitatif dan kuantitatif seperti pada penelitian ini digunakan untuk mengukur aktivitas enzim dari suatu larutan enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode DNS untuk mengukur jumlah gula reduksi yang terbentuk dari hasil hidrolisis substrat terhadap enzim (Putri., 2016).

2.9. Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa (GC-MS)

Gas chromatography (GC) atau Kromatografi gas merupakan metode pemisahan yang digunakan menganalisis senyawa yang mudah menguap atau senyawa yang mudah diuapkan. Kriteria menguap ini pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan. *Mass spectrometry* (MS) merupakan metode analisis instrumental yang digunakan untuk mengidentifikasi dan penentuan struktur dari komponen dan massa relatif hasil dari suatu pemecahan (Darmapatni dkk., 2016).

Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) merupakan Teknik kromatografi gas yang digunakan Bersama dengan spektrometri massa. GC berfungsi sebagai sarana pemisah tanpa dilengkapi dengan detektor sebagaimana GC pada umumnya tetapi berfungsi sebagai detektor adalah MS. Kemampuan dan aturan pemisahannya akan mengikuti aturan GC, demikian pula aturan fragmentasi dan pola spektrum massa akan mengikuti aturan MS. Kedua metode tersebut akan memberikan keuntungan yang lebih baik karena senyawa yang telah terpisahkan oleh GC dapat langsung dideteksi oleh MS. Detektor MS untuk kromatografi gas mempunyai beberapa keuntungan, antara lain yaitu penggunaan senyawa yang telah diketahui isotopnya sebagai standar meningkatkan ketelitian analisis serta pada resolusi tinggi dapat menentukan komposisi dasar dari senyawa yang dianalisis. Dengan adanya penggabungan kedua alat tersebut, maka GC-MS mampu memisahkan komponen-komponen dalam suatu analit sekaligus menentukan jenis komponen tersebut melalui spektrum massanya (Hotmian dkk., 2021). Komponen GC-MS dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Prinsip Kerja Spektrofotometer GC-MS

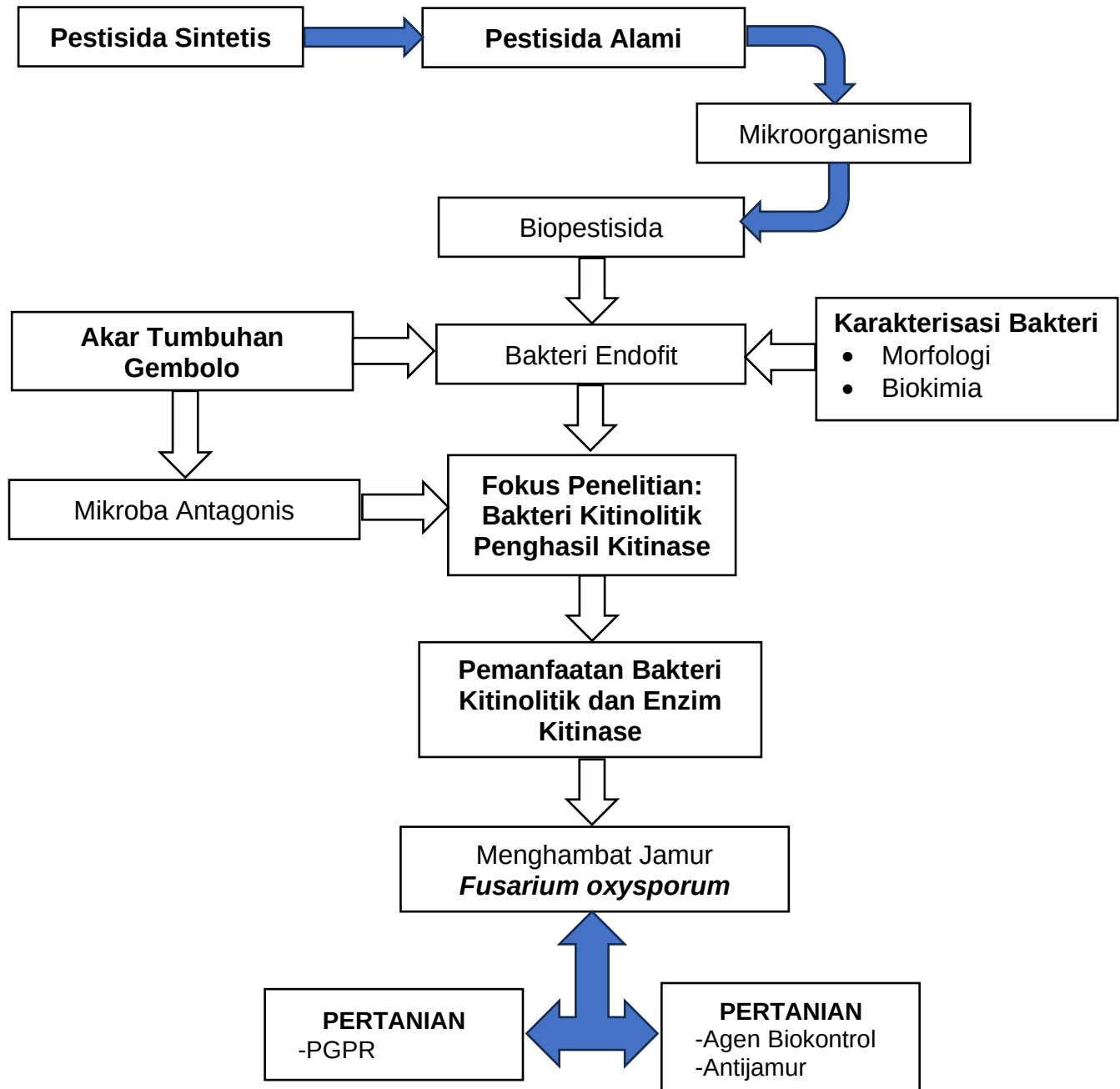
Prinsip kerja GC-MS adalah sampel yang berupa cairan diinjeksikan ke dalam injektor kemudian diuapkan. Sampel yang berbentuk uap dibawa oleh gas pembawa menuju kolom untuk proses pemisahan. Setelah terpisah, masing-masing komponen akan melalui ruang pengion dan dibombardir oleh elektron sehingga terjadi ionisasi. Fragment-fragment ion yang dihasilkan akan ditangkap oleh detektor dan dihasilkan spektrum massa (Margareta dan Wonorahardjo 2023).

2.10. Kerangka Pikir dan Hipotesis

2.10.1 Kerangka Pikir

Penggunaan pestisida sintetis dalam pertanian memiliki dampak negatif pada lingkungan seperti pencemaran air, tanah dan memberikan resiko bagi Kesehatan manusia. Hal ini dapat dijadikan sebagai pertimbangan untuk berpindah pada pestisida alami yang berasal dari sumber-sumber alam, seperti tanaman, hewan atau mikroorganisme. Penggunaan mikroorganisme dapat diperoleh dengan cara isolasi bakteri endofit pada tumbuhan gembolo (*Dioscorea bulbifera*). Gembolo mengandung sodium rendah serta protein yang tinggi dan digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati penyakit konjungtivitis, diare, disentri dan penyakit lainnya karena mengandung struktural tujuh clerodane diterpenoid baru yaitu Bafoudiosbulbins. Tanaman gembolo memiliki akar yang dapat diisolasi untuk memperoleh bakteri endofit. Isolat bakteri endofit mampu memproduksi hormon siderofor, pembentukan HCN dan memproduksi senyawa volatil. Bakteri endofit dapat menghambat pembusukan dan layu pada tanaman

yang disebabkan oleh mikroba antagonis pada tumbuhan. Mikroba antagonis dapat didegradasi dengan menggunakan enzim kitinase. Kitinase sebagai pemicu pertumbuhan tanaman karena mampu menginduksi lisis sel spesies bakteri tertentu. Penambahan rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman (PGPR) dapat memberikan peran penting dalam ketersediaan nutrisi sehingga meningkatkan efisiensi tanaman dalam penambahan unsur hara organik sebagai agensi biokontrol. Berikut kerangka pikir dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Kerangka Pikir Penelitian

2.10.2 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang, tinjauan pustaka dan kerangka berpikir yang telah diuraikan, maka dirumuskan hipotesis yaitu:

1. Bakteri endofit dapat diisolasi dan diidentifikasi dari akar gembolo (*Dioscorea bulbifera*).
2. Bakteri endofit dari akar tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*) memiliki aktivitas enzim kitinase.
3. Bakteri endofit dari akar tanaman gembolo (*Dioscorea bulbifera*) sebagai PGPR dalam agen biokontrol secara in vitro.