

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Penanganan terhadap hama atau penyakit pada tanaman yang disebabkan serangan cendawan dan insekta sejauh ini masih menggunakan insektisida dan fungisida maupun dengan bahan alternative lainnya yang dapat membunuh kedua kelompok organisme patogen tersebut. Menurut (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021) mengungkapkan bahwa penggunaan pestisida di seluruh dunia mencapai 4,15 juta ton pada tahun 2017 dan mulai mengalami kestabilan pada tahun 2018 yakni dengan penggunaan secara global sebanyak 4,12 juta ton. Wilayah Asia menjadi kontributor utama penggunaan pestisida secara global, yakni lebih dari 50% total pengguna pestisida dunia pada tahun 2018.

Penggunaan pestisida yang tinggi dikarenakan pestisida masih dianggap sangat penting sebagai pengendali hama tanaman. Namun, penggunaan pestisida secara terus menerus memiliki dampak yang buruk bagi kehidupan. Penggunaan pestisida yang berlebihan dan berkelanjutan menimbulkan berbagai masalah kesehatan dan pencemaran lingkungan, penurunan produktivitas tanah, serta keracunan pada hewan dan manusia (Supriyanto et al., 2021). Oleh karena itu, diperlukan pestisida alternative yang ramah lingkungan untuk dapat mengatasi organisme pathogen pada tanaman.

Pestisida alternative yang bersifat ramah lingkungan dapat diperoleh melalui pengembangan bioteknologi yang menghasilkan biopestisida. Biopestisida lebih aman dan spesifik terhadap patogen sasaran, tetapi hama non-target dapat tetap bertahan dan menimbulkan kerusakan. Kekurangan lainnya adalah keefektifan biopestisida dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti radiasi ultraviolet dan panas sehingga dapat diaplikasikan di pagi hari saja (Rajamani & Negi, 2020). Biopestisida berhasil diperoleh dengan memanfaatkan mikroorganisme (Jatoi et al., 2019). Salah satunya mikroba dari tanaman stroberi (Alijani et al., 2019).

Stroberi (*Fragaria* sp) merupakan salah satu tanaman komoditas buah-buahan dengan pasar konsumen yang besar di sektor ekonomi dunia. Hal ini dikarenakan stroberi dapat dibudidayakan di berbagai belahan dunia baik di daerah tropis maupun subtropis. Data yang diperoleh dari Badan Pusat Statistik tahun 2017-2020 menyatakan bahwa Sulawesi Selatan menjadi penghasil stroberi ke-5 terbanyak di Indonesia. Pangsa pasar yang tinggi dikarenakan stroberi banyak digemari dan merupakan sumber senyawa kimia yang memiliki kandungan antioksidan tinggi (Abduagani et al., 2021), memiliki aktivitas biologi seperti antiinflamasi (Gasparrini et al., 2020), antimikroba (Liya & Siddique, 2018), dan memiliki manfaat yang berkaitan dengan kesehatan (Fierascu et al., 2020). Oleh karena itu, budidaya stroberi perlu dikembangkan agar dapat memenuhi tuntutan permintaan



stroberi di Indonesia tak jarang mengalami penurunan. Berdasarkan data produksi stroberi di Indonesia yang diperoleh dari Badan Pusat Statistik

diketahui terjadi penurunan jumlah produksi stroberi tiap tahunnya pada tahun 2020 hingga 2023. Penurunan tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya akibat serangan cendawan dan insekta. Penyakit yang seringkali menyerang tanaman stroberi adalah penyakit layu yang disebabkan oleh jamur pathogen *Fusarium* sp (Putra et al., 2020).

Jamur *Fusarium* sp. salah satu dari bagian cendawan yang dinding selnya terusun atas kitin, sehingga keberadaan kitin ini menjadi salah satu target penting dalam upaya pengendalian pathogen ini. Kitin juga sebagai komponen penyusun dari insekta (Mohan et al., 2020). Kitin merupakan struktur dasar dan komponen utama dari dinding sel pada cendawan, sedangkan pada insekta terdapat pada kerangka bagian luar serangga (Abidin et al., 2020). Persentase kitin pada kutikula serangga sekitar 20-50% dari berat kering kutikula (Jantzen da Silva Lucas et al., 2021). Oleh karena itu, kitin menjadi salah satu komponen esensial dari kedua organisme tersebut. Kitin dapat dijadikan sebagai target dalam menghambat pertumbuhan kedua organisme tersebut agar tidak menjadi agen perusak tanaman.

Kitin dihidrolisis menjadi monomer N-acetyl glucosamine dengan bantuan enzim kitinase (Asif et al., 2020). Kitinase merupakan kelompok enzim glikosil hidrolase yang dapat menghidrolisis kitin menjadi molekul oligomer kitin yang lebih sederhana (Van Dyken & Locksley, 2018). Enzim kitinase dilaporkan bahwa dapat diproduksi oleh beberapa mikroorganisme seperti jamur dan bakteri baik secara intraseluler maupun ekstraseluler (Abu-Tahon & Isaac, 2020). Umumnya, bakteri penghasil kitinase mencerna organisme yang mengandung kitin sebagai sumber karbon untuk metabolisme tubuhnya (Nayak & Mishra, 2020).

Bakteri kitinolitik dapat ditemukan pada berbagai sumber seperti tanah (Shimoi et al., 2020), air (Tabli et al., 2018), limbah dalam air (A. Kumar et al., 2018), tanaman (Swiontek Brzezinska et al., 2020), dan usus binatang (Selvin et al., 2020). Namun, secara dominan bakteri kitinolitik diperoleh pada habitat tanah dan air (Dhole et al., 2021). Enzim kitinase dilaporkan juga dihasilkan oleh bakteri endofit kitinolitik yang terdapat pada beberapa tanaman (Daulagala, 2021).

Bakteri endofit termasuk ke dalam kelompok bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman, termasuk akar (Bhutani et al., 2021), batang (Duhan et al., 2020), daun (Płociniczak et al., 2019), dan bahkan buah (C. Chen et al., 2020). Namun, bagian akar memiliki jumlah bakteri endofit paling banyak dibandingkan dengan jaringan di atas tanah (Afzal et al., 2019). Hal ini dikarenakan pada bagian akar, terdapat eksudat akar yang menarik bakteri menguntungkan bagi tanaman (Widyati, 2020).

Mekanisme bakteri endofit dalam upaya menekan pertumbuhan pathogen di dalam jaringan tumbuhan melalui interaksi dengan inang terdiri atas beberapa mekanisme. Mekanisme bakteri endofit dalam melawan pathogen meliputi antibiosis, sistemik, dan kompetisi (Purnawati & Nirwanto, 2021). Akuisisi si fitohormon juga dianggap sebagai mekanisme langsung untuk tanaman sedangkan mekanisme yang tidak langsung namun dianggap menguntungkan seperti produksi enzim litik seperti enzim selulase, protease, kitinase, dan β -glukosidase yang mendegradasi dinding sel pathogen seperti cendawan dan bakteri (Afzal et al., 2020). Bakteri endofit berperan dalam peningkatan pertumbuhan



tanaman. Hormon pertumbuhan yang dilaporkan terkandung dalam bakteri endofit meliputi hormon IAA (*indole acetic acid*), sitokinin, giberelin, pelarut fosfat, dan penghasil siderofor (M. Singh et al., 2019). Oleh karena itu, bakteri endofit dapat pula berperan dalam meningkatkan imunitas tanaman terhadap penyakit atau pathogen.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini berfokus pada eksplorasi potensi bakteri endofit yang hidup di dalam jaringan akar tanaman stroberi sebagai sumber agen biokontrol ramah lingkungan. Melalui kemampuan menghasilkan enzim kitinase, bakteri endofit berpotensi menekan pertumbuhan patogen penyebab penyakit tanaman, seperti *Fusarium* sp., sekaligus mendukung upaya pengembangan pertanian berkelanjutan. Oleh karena itu, penelitian ini berjudul Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Enzim Kitinase dari Akar Tanaman Stroberi sebagai Agen Biokontrol.

1.2 Rumusan Masalah

1. Jenis bakteri endofit apa yang dapat diisolasi dari akar tanaman stroberi sebagai penghasil enzim kitinase?
2. Bagaimana aktivitas dan karakteristik sifat biokimiawi kitinase dari bakteri endofit dari akar stroberi?
3. Bagaimana menganalisis aktivitas bakteri endofit akar stroberi yang berpotensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* dalam agensia biokontrol biopestisida secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi jenis bakteri endofit dari akar stroberi penghasil enzim kitinase.
2. Menentukan aktivitas dan karakteristik sifat biokimiawi kitinase dari bakteri endofit akar pada kondisi optimum.
3. Menganalisis aktivitas bakteri endofit akar stroberi yang berpotensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dalam agensia biokontrol biopestisida secara in vitro.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang keberadaan bakteri endofit pada akar stroberi.
2. Menyediakan data mengenai potensi bakteri endofit sebagai PGPR dan agen biokontrol berbasis kitinase.
3. Menjadi dasar pengembangan biopestisida ramah lingkungan sebagai alternative
ida kimia.
tribusi bagi penelitian lanjutan di bidang mikrobiologi pertanian



o Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang terfokus pada isolasi dan identifikasi bakteri endofit penghasil kitinase dari akar tanaman stroberi, dilanjutkan dengan produksi dan karakterisasi enzim kitinase yang berperan dalam aktivitas antagonis terhadap jamur patogen. Isolat yang menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi kemudian diuji potensi biokontrolnya secara *in vitro* untuk melihat kemampuan menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium* sp. secara langsung.

1.6 Kebaruan Penelitian

1. Eksplorasi bakteri endofit dari akar tanaman stroberi yang tumbuh di kawasan kebun stroberi, Malino, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan, sebagai sumber agen biokontrol alami merupakan kajian yang belum banyak dilakukan, khususnya pada tanaman stroberi di wilayah tersebut.
2. Identifikasi kemampuan biokimiawi bakteri endofit stroberi dalam menghasilkan enzim kitinase, siderofor, HCN, dan senyawa volatil merupakan upaya baru untuk memahami mekanisme antagonistik bakteri terhadap patogen tanaman melalui aktivitas enzimatik dan produksi metabolit sekunder yang berperan dalam pengendalian hayati.
3. Karakterisasi enzim kitinase dari isolat bakteri endofit yang berasal dari akar tanaman stroberi di kawasan kebun stroberi, Malino, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan, memberikan informasi rinci mengenai kondisi optimum enzim kitinase yang sebelumnya belum pernah dilaporkan pada isolat endofit asal daerah tersebut.
4. Pengembangan strategi biokontrol berbasis mikroba endofit penghasil enzim dan metabolit bioaktif dari akar stroberi Malino berpotensi menjadi alternatif ramah lingkungan terhadap pestisida kimia, sekaligus mendukung penerapan sistem pertanian berkelanjutan di tingkat lokal maupun nasional.

1.7 Landasan Teoritis

1.7.1 Tinjauan Umum Stroberi

Stroberi (*Fragaria* sp.) merupakan tanaman budidaya dan dapat dikonsumsi. Stroberi adalah tanaman yang sangat populer sehingga dapat ditemukan hampir di seluruh dunia termasuk Indonesia. Tanaman ini termasuk ke dalam family *Rosaceae*. Stroberi merupakan jenis tanaman herba yang tumbuh rendah dengan sistem perakarannya serabut. Daunnya berbentuk spiral dan majemuk yang umumnya berjumlah tiga sebaran, serta biasanya berbulu. Bunga stroberi umumnya berwarna putih. Buahnya adalah suatu kelompok yang terdiri atas beberapa buah yang berbentuk oval.



yang terkandung pada beberapa bagian tanaman stroberi telah Buah stroberi mengandung jenis karbohidrat sederhana seperti glukosa, dan fruktosa (Sagbas et al., 2020). Kandungan vitamin C ditemukan pada buah stroberi (Ghiamati et al., 2020). Serat dan asam pada buah stroberi (Sagbas et al., 2020) Asam-asam organik

seperti asam sitrat, malat, tartarat, dan suksinat juga terdapat pada buah stroberi (Ikegaya et al., 2019).

Senyawa bioaktif seperti kandungan total fenolik terdapat pada buah (Bhutia et al., 2021) dan daun stroberi (Sato et al., 2019). Senyawa antosianin dilaporkan juga terkandung pada buah stroberi (Ganhao et al., 2019). Senyawa antosianin berperan sebagai pemberi warna pada buah stroberi. Terdapat tiga jenis senyawa yang memberikan warna pada buah stroberi yakni antosianin, β -karoten, dan likopen. Sedangkan pada daun, senyawa yang berperan dalam memberikan warna yaitu klorofil dan karotenoid (Žlabur et al., 2020).

Ellagitannin yang merupakan salah satu senyawa bioaktif pada tanaman stroberi terdapat pula pada bagian daun, buah, dan akar stroberi (Karlińska et al., 2021). Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Bahuguna et al., 2020) mengungkapkan bahwa senyawa bioaktif yang banyak terdapat pada akar stroberi adalah prosianidin atau proantosianidin, prosianidin trimer, kaemperol3-O-(4-O-p-koumaroil)-glukosida, asam neoklorogenik, prosianidin tetramer, dan kuarsetin-3-O-pentosida. Selain itu, beberapa enzim seperti enzim protease serin diperoleh dari isolate buah stroberi (Alici & Arabaci, 2018). Adanya beberapa komposisi kimia yang telah disebutkan menyebabkan stroberi memiliki beberapa aktivitas biologi seperti antioksidan (Nowicka et al., 2019), antiinflamasi (T. Chen et al., 2019), antimikroba (Cardoso et al., 2018; Gomes et al., 2018), antidiabetes (D. Yang et al., 2016), dan sitotoksik (Lucioli et al., 2019).

1.7.2 Bakteri Endofit

Komunitas mikroba yang bermanfaat dan terkait dengan ekosistem tanaman dikelompokkan menjadi tiga kategori, misalnya filosfer, endofit, dan rizosfer (Yadav, 2021). Endofit berasal dari kata Yunani yaitu endon yang bermakna di dalam dan phyton yang berarti tanaman, karena itulah endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme yang bersimbiosis dan berkoloni yang terdapat di dalam bagian tanaman. Mikroorganisme yang dimaksud terdiri atas jamur atau bakteri yang dapat memberikan keuntungan terhadap tanaman inang (Vasileva et al., 2019).

Bakteri endofit dilaporkan telah berhasil diisolasi dari berbagai tanaman dan hampir terdapat di setiap jaringan bagian tanaman seperti akar pohon cemara Himalaya (Adhikari & Pandey, 2020), batang pohon zaitun (Zicca et al., 2020); batang tanaman mulberi (Ou et al., 2019), daun longusei (Tallei et al., 2020), atau biji jagung (F. Yang et al., 2020); biji selada berduri (Jeong et al., 2021). Pada beberapa tumbuhan ditemukan bahwa penyebaran bakteri endofit yang terdapat pada bagian akar lebih banyak dibandingkan dengan bagian lainnya (Fan et al., 2022). Hal ini dikarenakan sebagian besar dari bakteri endofit berasal dari rizosfer tanah (W. Wang



yang sudah banyak dilaporkan terdapat pada isolate bakteri apa tanaman diantaranya adalah *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *obacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Pantoea*, *tenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *acterium*, *Chryseobacterium*, dan *Chitinophaga* (Mei et al., 2021;

Wu et al., 2021). Keanekaragaman bakteri endofit terdiri atas bakteri gram positif dan bakteri gram negative (Bashir et al., 2020). Hal yang sama diungkapkan oleh (Zerihun et al., 2019) bahwa persentase isolate bakteri di rizosfer lebih tinggi bakteri gram negative dibandingkan bakteri gram positif.

Penyebaran kolonisasi bakteri endofit dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik yang mempengaruhi kolonisasi bakteri endofit meliputi genotype (Sexton et al., 2020), tahap perkembangan (Ren et al., 2015), dan fisiologi tanaman (R. Yang et al., 2017), eksudat akar (Lin et al., 2020), metabolit sekunder (Dang et al., 2020), serta interaksi mikroba-mikroba dalam inang (Egamberdieva et al., 2017). Sedangkan faktor abiotik meliputi kondisi tanah, adanya polusi, kelembapan, pH, suhu, dan perubahan iklim (Papik et al., 2020).

Bakteri endofit yang diisolasi dari jaringan tanaman menghasilkan sejumlah metabolit bioaktif yang dapat diaplikasikan pada berbagai bidang, seperti kesehatan, industry, dan pertanian. Beberapa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri endofit diantaranya adalah senyawa alkaloid berupa vindoline dihasilkan oleh *Mycrobacterium* sp. yang bermanfaat dalam pengobatan leukemia (Anjum & Chandra, 2019); camptothecin yang dihasilkan oleh *Kytococcus* yang bermanfaat sebagai antikanker (Ghiasvand et al., 2020); ginsenoside dihasilkan oleh *Agrobacterium rhizogenes* yang dapat diaplikasikan dalam industri farmasi (Yan et al., 2019). Selain senyawa-senyawa tersebut, terdapat pula metabolit antijamur yakni senyawa eicosane, tetratetracontane, heneicosane, hexatriacontane, dan fenol dari bakteri *Chryseobacterium proteolyticum* yang diisolasi dari tanaman coklat dapat dimanfaatkan dalam dunia pertanian dalam mengontrol pathogen (Alsultan et al., 2019).

Penggunaan bakteri endofit sebagai pengendali tanaman menguntungkan karena bakteri endofit hidup dalam jaringan tanaman sehingga berkesempatan untuk selalu berinteraksi dengan sel-sel tanaman dan karena itu pula dapat lebih mudah memberikan dampak langsung yang bermanfaat (Santoyo et al., 2016). Selain itu, bakteri endofit memberikan manfaat kepada tanaman inang sebagai hasil dari hubungan mutualisme yakni meningkatkan zat gizi yang dapat diperoleh inang tanaman, berfungsi sebagai pelindung dari hama, meningkatkan kapasitas tanaman untuk bertahan atau mentoleransi faktor lingkungan, serta membantu dalam perkembangan tanaman (P. Singh et al., 2021). Oleh karena itu, bakteri endofit banyak dimanfaatkan sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman.

Hal yang utama dianjurkan terlebih dahulu sebelum isolasi bakteri endofit yakni sterilisasi seluruh permukaan sampel diikuti dengan memotong organ dan jaringannya menjadi beberapa bagian dengan pisau yang disterilkan. Bakteri endofit pada tanaman dapat dengan mudah diisolasi dengan menggunakan berbagai media



agar kentang dekstrosa, dan media yang mengandung nitrogen et al., 2019). Kolonisasi bakteri endofit dapat dengan mudah roskopis menggunakan alat *Transmission Electron Microscopy in situ Hybridization* (FISH), *Triphenyl Tetrazolium Chloride Vital laser scanning microscopy*, sedangkan untuk mengidentifikasi

bakteri endofit dapat dilakukan dengan mengisolasi DNA genom dan amplifikasi PCR gen 16rRNA, ITS/18S rRNA (Chu & Bae, 2022).

Stroberi merupakan salah satu tanaman yang dapat menghasilkan bakteri endofit. Bakteri endofit tersebar tidak hanya di satu area saja melainkan tersebar di berbagai bagian anatomi pada tanaman stroberi. Hal ini menunjukkan bahwa stroberi menyediakan lingkungan internal yang luas dan mendukung bagi populasi bakteri endofit ini untuk menetap dan memiliki hubungan yang mutualistik. Hasil penelitian terkait bakteri endofit pada tanaman stroberi diuraikan pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Hasil penelitian terkait bakteri endofit pada stroberi

Bakteri Endofit	Sumber Isolat	Aplikasi	Referensi
<i>Bacillus safensis</i>	Buah	Biokontrol	(Hassan et al., 2021)
<i>Bacillus cereus</i>	Daun	Biokontrol	(Martins et al., 2021)
<i>Bacillus</i> sp.	Daun dan akar	Antijamur	(Moura et al., 2021)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Buah	Antijamur	(C. Chen et al., 2020)
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	Daun dan tangkai daun	Antijamur	(Marian et al., 2020)

1.7.3 Mikroba Antagonis terhadap Patogen pada Stroberi

Mikroba antagonis adalah mikroba dari berbagai kelompok seperti kelompok bakteri, jamur, maupun khamir yang memiliki aktivitas antagonis atau penghambat terhadap patogen tanaman sehingga dapat digunakan sebagai agen biokontrol hayati. Mikroba antagonis telah banyak diaplikasikan pada beberapa tanaman seperti bakteri jenis *Brevundimonas terrae* memiliki daya penghambatan terhadap patogen *Alternaria panax* penyebab penyakit bintik hitam pada tanaman ginseng (Sun et al., 2017), dan bakteri *Bacillus methylotrophicus* memiliki daya hambat yang tinggi terhadap pathogen tanaman tomat (Im et al., 2020).

Fusarium oxysporum merupakan jenis cendawan yang bersifat patogen dan dapat ditemukan pada daerah rizosfer stroberi (Putra et al., 2020). Mikroba antagonis yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Fusarium oxysporum* pada stroberi dapat berupa bakteri maupun cendawan. Kelompok *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma album*, dan *Trichoderma viride* merupakan cendawan yang dilaporkan memiliki aktivitas antagonis terhadap jenis *Fusarium solani* dan *Fusarium oxysporum* dengan persentase efikasinya masing-masing sebesar 77%, 72%, dan 72% (Ahmed et al., 2020). Selain cendawan jenis *Trichoderma* yang dapat mengendalikan *F. oxysporum* pada stroberi, maka terdapat pula cendawan jenis *Arbuscular mycorrhizae* yang dilaporkan oleh (Li et al., 2019) juga memiliki sifat antagonis terhadap *F. oxysporum* sp.

Bakteri juga memiliki kemampuan antagonis terhadap *Fusarium* sp. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Abd-El-Kareem et al., 2022)

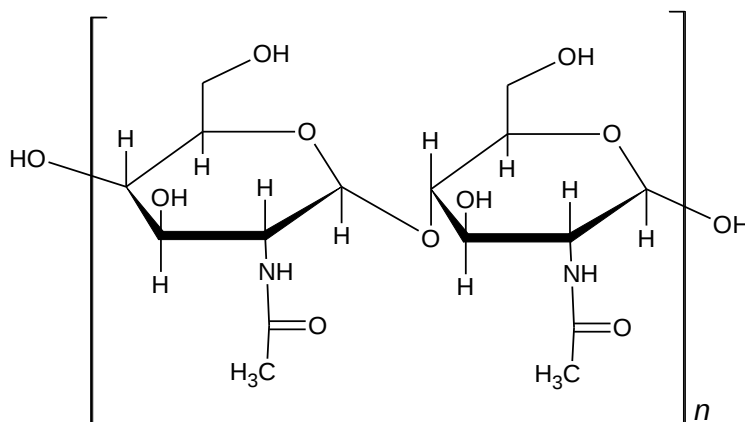


membuktikan bahwa terdapat peningkatan pertumbuhan tanaman oleh bakteri jenis *Paenibacillus polymyxa* dan *Bacillus brevis*. Jenis kedua bakteri tersebut dapat mengurangi terjadinya penyakit busuk akar hitam dan keparahannya pada tanaman stroberi dengan persentase pengurangan terjadinya penyakit busuk akar hitam oleh *Paenibacillus polymyxa* dan *Bacillus brevis* masing-masing adalah 76,9% dan 71,2% sedangkan persentase pengurangan tingkat keparahannya masing-masing adalah 78% dan 70%.

Bakteri jenis lainnya juga dilaporkan oleh (De la Lastra et al., 2021) bahwa dari tiga jenis bakteri yang diujikan yakni *Streptomyces fradiae* (Hvs6), *Bacillus paralicheniformis* (Hvs2) dan *Bacillus velezensis* (FC37), yang sangat efektif dalam menghambat pertumbuhan patogen jenis *Fusarium proliferatum* (Fp), *F. oxysporum* F sp. *asparagi* (Fo) adalah bakteri jenis *Bacillus velezensis* (FC37) dan *Bacillus paralicheniformis* (Hvs2) namun tidak dapat mencegah *F. redolens* (Fr). *Bacillus velezensis* (FC37) dan *Bacillus paralicheniformis* (Hvs2) masing-masing menghambat sebesar 73% dan 82% pertumbuhan cendawan.

1.7.4 Kitin

Kitin merupakan biopolymer alami kedua yang paling banyak ditemukan di alam setelah selulosa. Struktur dari kitin adalah poli[β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranososa] (Roberts, 1992). Struktur dari kitin menyerupai struktur dari selulosa, hanya berbeda pada gugus C(2)-hidroksil pada selulosa digantikan oleh gugus asetamido pada kitin. Kitin pertama kali dinyatakan oleh seorang peneliti dari Prancis yakni Braconnot pada tahun 1811 melalui hasil penelitiannya pada jamur (Jolles & Muzzarelli, 1999). Gambar 1.2 adalah struktur dari kitin.



Gambar 1.1. Struktur kitin



terdapat pada invertebrate seperti di cangkang krustasea (Jantzen da Silva Lucas et al., 2021). Kitin juga ditemukan di dinding sel jamur (Erdogan et al., 2017). Kandungan kitin pada mikroorganisme berbeda-beda bergantung pada spesiesnya.

Contohnya pada beberapa spesies krustasea jenis udang, kepiting, dan lobster mengandung kitin sekitar 20-23% (Mohan et al., 2021), sedangkan pada beberapa jenis insekta seperti lalat tentara hitam, dan puparia juga mengandung kitin dengan kisaran yang sama yakni 7-20% lebih (Brigode et al., 2020). Kandungan kitin yang terdapat pada jenis jamur *L. vellerus* sebesar 11,4% sedangkan pada jenis *P. ribis* sebesar 7,9% (Erdogan et al., 2017). Hal ini pula menunjukkan bahwa perbedaan jenis spesies jamur juga mempengaruhi kandungan kitin yang dikandungnya.

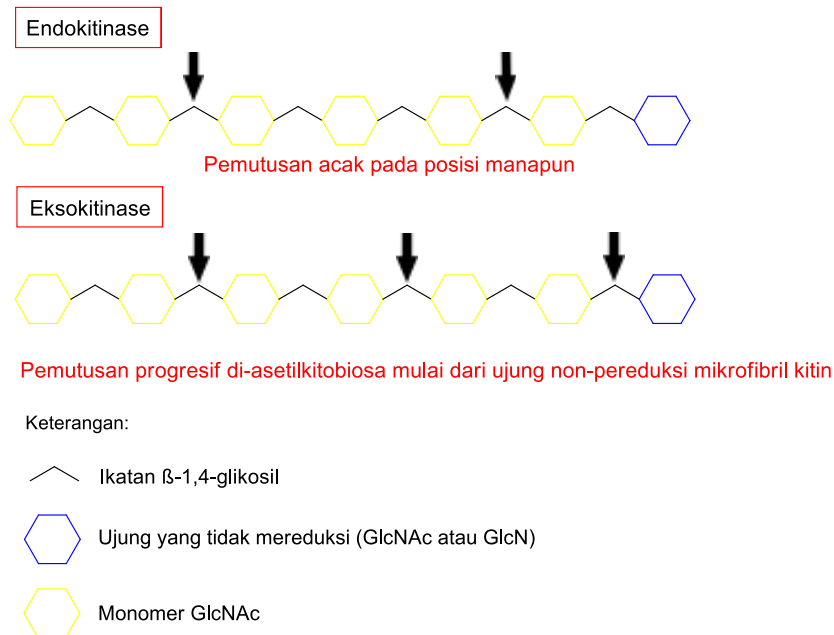
Berdasarkan sumbernya, kitin memiliki dua bentuk polimer utama yakni α -kitin dan β -kitin. Sedangkan variasi bentuk γ -kitin merupakan kombinasi dari α -kitin dan β -kitin (Khayrova et al., 2021). α -kitin dapat ditemukan pada kelompok krustasea contohnya jenis *Acetes* spp. (Dhanabalan et al., 2021), kelompok jamur contohnya *Agaricus bisporus* (Hassainia et al., 2017), juga kelompok insekta contohnya pada tahapan perkembangan lalat tentara hitam (H. Wang et al., 2020). Beberapa jenis dari kelompok krustasea seperti udang jenis *Penaeuuse semisulcatuse* memiliki bentuk polimer β -kitin (Esvandi et al., 2019) sedangkan γ -kitin dapat ditemukan pada dinding sel jamur maupun khamir (Kumari & Kishor, 2020). Bentuk polimer α -kitin lebih melimpah di alam dibandingkan dengan bentuk yang lainnya karena strukturnya yang lebih stabil di antara kedua bentuk lainnya (Roberts, 1992).

Kitin tidak dapat larut dalam semua pelarut biasa seperti air, larutan asam, larutan alkali, dan pelarut organik namun dapat larut dalam asam-asam organik dengan konsentrasi tinggi seperti asam klorida, asam sulfat, dan asam fosfat (El Knidri et al., 2018). Kitin yang memiliki tingkat kemurnian tinggi maka memiliki kadar mineral yang rendah (Huet et al., 2020). Keberadaan mineral pada kitin menyebabkan kitin memiliki stabilitas thermal yang tinggi dibandingkan turunannya yakni kitosan. Selain itu, kitin juga memiliki aktivitas antijamur dan antibakteri yang baik (Battampara et al., 2020).

1.7.5 Kitinase

Kitinase adalah enzim yang dapat menghidrolisis kitin dengan memutus ikatan glikosidik dari polimer β -1,4 N-asetil-D-glukosamin. Proses hidrolisis kitin oleh kitinase ini menghasilkan monomer kitin yakni N-asetilglukosamin. Kitinase termasuk ke dalam kelompok hydrolase glikosil. Kitinase diklasifikasikan ke dalam dua kategori berdasarkan letak dimana pemotongan kitin yakni endo-kitinase dan ekso-kitinase. Endo-kitinase memotong ikatan β -1,4 glikosil secara acak pada sisi internal kitin sehingga menghasilkan kitin yang memiliki berat molekul rendah oligomer N-asetilglukosamin (GlcNAc) seperti kitotetraose, kitotriose, dan kitobiose sedangkan ekso-kitinase memotong ikatan β -1,4 glikosil dalam kitin dari ujung non-pereduksi (Dhanabalan & Kumar, 2020).





Gambar 1.2. Ilustrasi perbedaan endokitinase dan eksokitinase berdasarkan cara pemutusan kitin

Berat molekul dari kitinase terdapat pada rentang 30 sampai 120 kDa yang diobservasi pada bakteri dan jamur (Jolles & Muzzarelli, 1999). Berat molekul dari kitinase yang diperoleh dari bakteri *Paenibacillus* sp. adalah 30 kDa (Du et al., 2021). Karakteristik dari kitinase dapat pula ditinjau dari aktivitas enzimnya. Aktivitas enzim kitinase dapat dipengaruhi oleh beberapa kondisi diantaranya yaitu suhu, pH, dan inhibitor serta activator enzim. Suhu optimum dari kitinase yang dihasilkan oleh bakteri *Paenibacillus* sp. adalah 65 °C sedangkan pH optimumnya adalah 4,5 (W. Zhang et al., 2021). Bakteri laut *Bacillus* sp. memiliki suhu optimum 30 °C sedangkan pH optimumnya adalah 7,5 (Cheba et al., 2018). Ion logam Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , and Ni^{2+} dapat meningkatkan aktivitas enzim kitinase sedangkan ion logam Cu^{2+} merupakan inhibitor enzim kitinase yang dihasilkan *Paenibacillus* sp. (Du et al., 2021).

Kitinase dapat dihasilkan oleh makhluk hidup penghasil kitinase diantaranya yaitu jamur (Suryawanshi & Eswari, 2022), bakteri (Tran et al., 2018), tumbuhan (Hanin et al., 2020), maupun hewan (Sulistijowati et al., 2021). Kitinase oleh bakteri dimanfaatkan dalam asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Jabeen et al., 2018). Kitinase pada jamur terlibat dalam beberapa aktivitas biologi jamur seperti pada pembentukan kembali dinding sel selama pertumbuhan hifa, proses nidia, autolysis, mikoparasitisme, dan pada proses akuisisi nutrisi (on, 2019). Pada tumbuhan, kitinase menjadi sangat penting dalam imunitas tanaman (Ökmen et al., 2018). Oleh karena bertindak sebagai biokontrol dengan melepaskan enzim kitinase kitinolitik tersebut menyebabkan peningkatan pertumbuhan et al., 2021).



Kitinase sebagai biokontrol dan berpotensi sebagai biopestisida merupakan salah satu aplikasi dari kitinase dalam bidang agrikultur. Aktivitas antijamur yang sangat tinggi dengan daya hambat yang kuat oleh isolate bakteri *Streptomyces alfalfa* terhadap *B. cinereal*, *R. solani*, dan *T. longibrachiaum*, juga pada *F. graminearum*, *R. cerealis* dan *S. sclerotiorum* menunjukkan bahwa *Streptomyces alfalfa* sangat berpotensi untuk digunakan sebagai agen biokontrol (Lv et al., 2021). Kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus pumilus* memperlihatkan secara genetic pada *Bacillus subtilis* menggunakan teknik coating protein dapat menghambat pertumbuhan patogen tanaman secara alami sehingga sangat mampu dikembangkan sebagai biopestisida terbaru (Rostami et al., 2017). Hasil penelitian terkait produksi kitinase oleh mikroorganisme ditunjukkan pada Tabel 1.2.

Tabel 1.2. Hasil penelitian terkait produksi kitinase oleh berbagai mikroorganisme

Nama Mikroba	Sumber Isolat	Aplikasi	Referensi
<i>Trichoderma viride</i>	Tanah tanaman mangrove	Antikanker dan antijamur	(Abu-Tahon & Isaac, 2020)
<i>Chitinopaga</i> sp	Tanah	Biokontrol tanaman	(S. Sharma et al., 2020)
<i>Bacillus</i> sp	Tanah	Depolimerisasi kitin dan antijamur	(Dukare et al., 2020)
<i>Bacillus</i> sp	Akar	Biokontrol tanaman dan antijamur	(Padder et al., 2022)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Air laut	Antijamur	(Atalla et al., 2020)
<i>Tricoderma</i> sp.	Kutu busuk	Mengontrol fitopatogen nematoda	(Bortoluzzi Baldoni et al., 2020)

1.7.6 Plant Growth Promoting Rhizosphere (PGPR)

Mikroorganisme yang melimpah terdapat di lingkungan tanah, terkhusus mikroorganisme rizosfer. Kelompok mikroba yang terdapat di rizosfer termasuk bakteri, jamur, mikroorganisme bersel satu seperti *archaea*, alga, nematode, protozoa, virus, dan mikroorganisme invertebrate. Mikroba tersebut mengolonisasi semua ekologi (niches) akar sampai semua tahap perkembangan tanaman, bahkan pada keberadaan bagian tumbuhan yang bersaing (Prasad et al., 2019). Mikroba rizosfer tersebut ada yang bersifat menguntungkan bagi tanaman namun ada pula yang bersifat merugikan. Bakteri rizosfer atau pengoloni akar yang memberikan pengaruh menguntungkan bagi tanaman dikenal dengan istilah PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizosphere*).



PGPR memberikan peningkatan pertumbuhan tanaman melalui mekanisme baik secara langsung maupun tidak langsung. Sejumlah mekanisme yang dihasilkan oleh PGPR melalui mekanisme langsung dengan fiksasi nitrogen, produksi hormon seperti indole acetic acid (IAA), sitokinin, dan giberelin, serta pembentukan siderofor sedangkan mekanisme secara tidak langsung melalui pembentukan enzim litik, antibiotik, ammonia, dan metabolit lainnya.

sekunder (Lau et al., 2020; Rasool et al., 2021). Sejumlah senyawa yang dihasilkan dari mekanisme langsung maupun tidak langsung ini mampu meningkatkan secara cepat nutrisi dari tanah dan melindungi tanaman dari infeksi pathogen (Orozco-Mosqueda et al., 2018). Selain itu, juga dapat melindungi tanaman dengan menekan sisa-sisa logam berat (Guo et al., 2020).

Terdapat tiga kategori PGPR yakni sebagai biopestisida, biofertilizer, dan fitostimulator (Riaz et al., 2020). Perbedaan ketiganya disajikan pada Tabel 1.3. PGPR memiliki berbagai keuntungan dalam peningkatan pertumbuhan tanaman. Oleh karena itu, aplikasi PGPR memberikan solusi yang baik bagi pertanian yang berkelanjutan. Aplikasi PGPR seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa dapat digunakan sebagai biokontrol tanaman yang dapat mengendalikan penyakit tanaman, meningkatkan pertumbuhan serta memenuhi nutrisi pada tanaman sehingga dapat meminimalkan penggunaan pestisida kimia dalam dunia pertanian.

Tabel 1.3. Perbedaan tipe PGPR

Tipe PGPR	Pengertian	Mekanisme	Referensi
Fitostimulator	Mikroorganisme yang dapat memproduksi fitohormon seperti auxin, ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), sitokinin dan giberelin.	Sintesis fitohormon	(Kenneth et al., 2019)
Biopestisida	Mikroorganisme yang menguntungkan dan dapat mengontrol insekta.	Produksi enzim litik, induksi ketahanan gene, sintesis antibiosis, HCN dan senyawa volatil	(Suganthi et al., 2021)
Biofertilizer	Zat yang mengandung mikroorganisme hidup yang jika diaplikasikan pada tanaman dapat meningkatkan pertumbuhan atau peningkatan ketersediaan nutrisi tanaman inang.	Pelarutan fosfat, produksi siderofor, biofiksasi nitrogen	(Sultana et al., 2021)
	Mikroorganisme dengan kemampuan menangkap logam berat	Produksi siderofor yang kelat logam berat	(V. Kumar et al., 2019)



th Promoting Rhizosphere (PGPR) sebagai Biokontrol

Biospestisida merupakan salah satu bagian dari tipe PGPR dan menjadi biologi kontrol yang digunakan untuk mengontrol populasi hama atau pengganggu pada tanaman. Berdasarkan dari bahan dasarnya biopestisida dibagi menjadi tiga kelas yakni 1) pestisida biokimia adalah zat alami yang mengendalikan hama dengan mekanisme tidak beracun; 2) pestisida mikroba terdiri dari mikroorganisme (misalnya, bakteri, jamur, virus atau protozoa) sebagai bahan aktif; 3) *Plant Incorporated Protectants* (PIPs) adalah zat pestisida yang dihasilkan tanaman dari materi genetik yang telah ditambahkan ke tanaman. PGPR dengan sifat biokontrolnya dapat menjadi solusi alternatif terhadap dosis tinggi pengaplikasian pestisida kimia. Mekanisme yang digunakan oleh PGPR sebagai biopestisida diantaranya adalah produksi antibiotik, enzim litik, hidrogen sianida, senyawa volatil, induksi pertahanan sistem, dan pembentukan siderofor (Prasad et al., 2019).

Berikut ini merupakan penjelasan setiap mekanisme dari PGPR sebagai biopestisida.

Produksi enzim litik. Mikroba rizosfer dan endofit melepaskan enzim kitinase, β -1,3-glukanase, selulase, dan protease untuk menghambat atau mengendalikan pertumbuhan patogen tanaman tular tanah (bakteri dan jamur) (Mukherjee et al., 2020). Kitinase merupakan enzim yang mampu mendegradasi kitin yang merupakan komponen utama dinding sel jamur. *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari tanah di sekitar rumput mengandung enzim litik protease, cellulose, dan kitinase serta dapat menghambat *F. oxysporum* dan *A. solani* (Paramanandham et al., 2017). *Paenibacillus polymyxa* juga dilaporkan menghasilkan enzim litik berupa β -1,3-glukanase, selulase, dan protease (Zhai et al., 2021). Isolate *Pseudomonas fluorescens* menghasilkan aktivitas protease dan kitinase yang tertinggi kemudian diikuti dengan β -1,3-glukanase, sedangkan aktivitas yang terendah adalah aktivitas enzim selulase dan polygalacturonase dalam menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* (Rathore et al., 2020).

Produksi hidrogen sianida. Hidrogen sianida (HCN) adalah senyawa volatil yang disintesis oleh tumbuhan dan juga mikroorganisme termasuk jamur dan bakteri. Beberapa jamur dan bakteri bertindak sebagai antagonis dan menginduksi resistensi penyakit pada organisme inang dengan memproduksi berbagai senyawa termasuk hidrogen sianida yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman (Bilen & Turan, 2022). Contohnya yaitu pada rizobakteri beberapa tanaman di Mesir menghasilkan isolat bakteri penghasil senyawa HCN yang mampu menghambat pertumbuhan *Agrobacterium tumefaciens* dan mengurangi populasi nematode *Meloidogyne incognita* pada tanaman tomat. Oleh karena itu, HCN berpotensi sebagai biokontrol dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman (Abd El-Rahman et al., 2019).



senyawa volatil. Senyawa organik volatil merupakan bahan molekul rendah dan tekanan uap tinggi sehingga dengan mudah uap ruang. Senyawa organik volatil meliputi senyawa alkohol, ester, dan lakton. Senyawa organik volatil memiliki hubungan dengan *Plant* (PGP) atau peningkatan pertumbuhan tanaman dan aktivasi

mekanisme pertahanan dengan memicu resistensi sistemik yang diinduksi atau *induced systemic resistance* (ISR) pada tumbuhan (Shafi et al., 2017).

Senyawa organik volatil yang secara spesifik berhasil dihasilkan oleh isolat bakteri *Pseudomonas* sp. adalah 2-undecanone, methyl thiocyanate, 2-undecanol dan 2-nonanol dan diantara keempat senyawa tersebut, 2-undecanone yang menunjukkan aktivitas antijamur terhadap *V. dahliae*, sedangkan isolat bakteri *P. simiae* menghasilkan beberapa senyawa organik volatil diantaranya adalah tridecane, 2,5-dimethylpyrazine, 1-decene dan 2-decyloxirane dan dilaporkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas antijamur terhadap beberapa pitopatogen seperti *Pseudomonas syringae* pv. *Penicillium italicum*, *Sclerotinia minor*, *Pythium ultimum*, *R. solani* atau *B. cinerea* (Montes-Osuna et al., 2022). Senyawa volatil keton seperti 2-undecanone yang dihasilkan oleh beberapa organisme memiliki aktivitas antijamur dikarenakan senyawa volatile keton memiliki aktivitas antagonis yang tinggi (López et al., 2021).

Bakteri endofit dari jenis *Bacillus* sp. yang diperoleh dari hasil isolasi tanaman tomat juga dilaporkan menghasilkan senyawa organik volatil yang memiliki aktivitas antijamur terhadap *Rhizoctonia solani* dengan nilai IC_{50} sekitar 0,09 mL L⁻¹. Senyawa tersebut adalah 2-Heptanone; Pyrazine, 2,5-dimethyl-; Naphthalene; Benzenamine, dan N-ethyl- yang terbukti mampu dalam mengurangi aktivitas *R. solani* baik sebelum maupun pasca panen (Marzouk et al., 2021). Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Y. Zhang et al., 2021) menjelaskan bahwa aktivitas antijamur bakteri *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aureofaciens* terhadap patogen *Ceratocystis fimbriata* penyebab penyakit busuk hitam pada kentang melalui mekanisme senyawa organik volatil yang dihasilkan oleh isolate bakteri *P. chlororaphis* menyebabkan perubahan morfologi hifa, merusak integritas membrane sel, mengurangi kandungan ergosterol, dan menginduksi akumulasi stress oksidatif dan disfungsi mitokondria pada *Ceratocystis fimbriata*.

Pembentukan siderofor. Siderofor merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan dari mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Siderofor memiliki berat molekul yang rendah serta afinitas yang tinggi untuk ferik atau besi(III) (Albelda-Berenguer et al., 2019). Hasil penelitian yang dilaporkan oleh (Chuljerm et al., 2020) juga menyatakan bahwa siderofor yang diisolasi dari bakteri *B. megaterium* memiliki massa molekul yaitu 420 Da dan bakteri *B. megaterium* memiliki afinitas yang kuat untuk besi(III) dan menurunkan kadar kumpulan besi yang dapat dikelat atau *labile iron pool* (LIP).

Hasil penelitian membuktikan bahwa siderofor dapat dihasilkan dari bakteri (Delaporte-Quintana et al., 2020) maupun jamur (Chowdappa et al., 2020). Siderofor yang dihasilkan oleh mikroorganisme biasanya diklasifikasikan sebagai catecholate, oxalate, dan tipe campuran (Maheshwari et al., 2019). Isolat jamur *A. oryzae* pada padi menghasilkan siderofor tipe carboxylate (Lari, 2021). Penelitian terhadap siderofor tipe catecholate dan dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri dilaporkan oleh (C. M. H. 19) bahwa *Azotobacter vinelandi* menghasilkan siderofor tipe oxamate, *Bacillus megaterium* menghasilkan siderofor tipe



hydroxamate, *Bacillus subtilis* menghasilkan siderofor tipe catechol, *Pantoea allii* menghasilkan siderofor tipe hydroxamate, sedangkan *Rhizobium radiobacter* menghasilkan tipe catechol.

Kurangnya penyerapan Fe dari tanah membatasi pertumbuhan tanaman, karena umumnya bakteri mendapatkan Fe melalui sekresi siderophores. Besi (Fe^{3+}) dalam Fe^{3+} kompleks siderophore pada membran bakteri direduksi menjadi Fe^{2+} yang selanjutnya dilepaskan ke dalam sel dari siderofor melalui mekanisme gerbang yang menghubungkan membran dalam dan luar. Oleh karena itu, siderophores bertindak sebagai agen pelarut ekstraseluler untuk besi dari mineral dalam kondisi kekurangan besi dan meningkatkan pertumbuhan tanaman (Pourbabaee et al., 2018).

Hasil penelitian yang dilaporkan oleh (Gao et al., 2019) membuktikan bahwa tanaman yang kekurangan Fe dan diaplikasikan bakteri *Pseudomonas* yang diisolasi dari batang apel yang ditanam di tanah alkalin, maka diperoleh hasil bahwa terdapat peningkatan biomassa perkembangan akar, dan konsentrasi Fe diamati pada tanaman apel. Hal tersebut dikarenakan isolat bakteri menghasilkan pioverdin yaitu suatu siderofor yang dapat mengkhelat Fe^{3+} untuk meningkatkan bioavailabilitas Fe untuk tanaman.

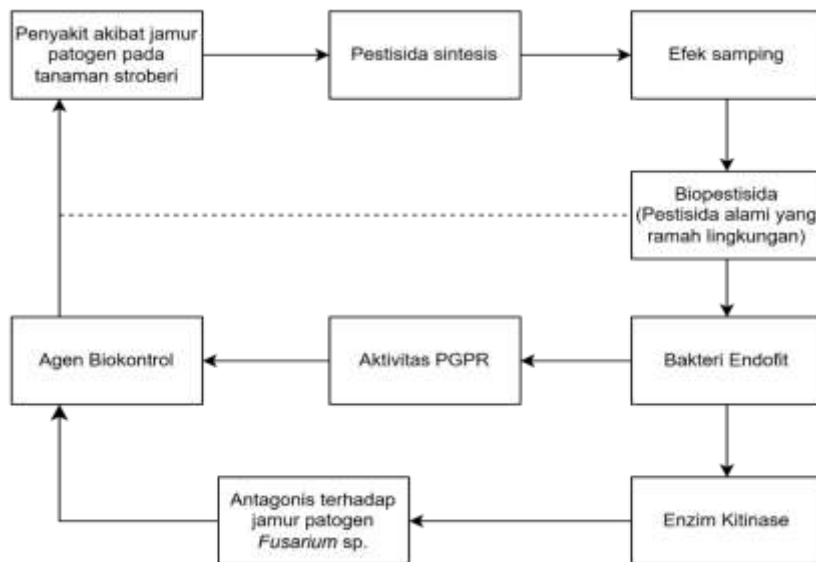
1.8 Kerangka Konseptual

Tanaman stroberi rentan terhadap serangan jamur patogen seperti *Fusarium* sp. yang dapat menyebabkan penyakit layu dan menurunkan produktivitas tanaman. Upaya umum yang dilakukan untuk mengatasi penyakit ini adalah dengan penggunaan pestisida sintetis. Namun penggunaan pestisida sintetis secara terus-menerus menimbulkan efek samping seperti pencemaran lingkungan, resistensi patogen, serta gangguan keseimbangan mikroba tanah. Sebagai alternatif yang lebih ramah lingkungan, dikembangkan biopestisida, yaitu spesifikasi alami yang bersumber dari mikroorganisme, salah satunya bakteri endofit. Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif, bahkan mampu memberikan manfaat bagi tanaman inangnya. Salah satu manfaat pentingnya adalah melalui aktivitas *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), yang tidak hanya mendukung pertumbuhan tanaman, tetapi juga berperan sebagai agen biokontrol terhadap patogen tanaman.

Aktivitas biokontrol dari bakteri endofit dapat disebabkan oleh kemampuannya menghasilkan berbagai senyawa metabolit sekunder dan enzim hidrolitik, termasuk enzim kitinase. Enzim kitinase mampu mendegradasi kitin, yaitu komponen utama penyusun dinding sel jamur patogen seperti *Fusarium* sp. Oleh karena itu, keberadaan bakteri endofit penghasil enzim kitinase berpotensi menghambat patogen tersebut. Dalam konteks ini, penelitian dilakukan untuk identifikasi, dan mengarakterisasi bakteri endofit penghasil enzim anaman stroberi. Isolasi bertujuan untuk memperoleh kandidat g hidup di jaringan akar stroberi. Identifikasi dilakukan untuk atau spesies bakteri yang potensial. Sementara itu, karakterisasi mpuan bakteri dalam menghasilkan enzim kitinase dan aktivitas



PGPR lainnya (seperti produksi HCN, siderofor, dan senyawa volatil), yang berkaitan dengan potensi antagonistik terhadap *Fusarium* sp. Hasil akhir dari penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan agen biokontrol potensial berbasis bakteri endofit penghasil enzim kitinase yang dapat dikembangkan sebagai biopestisida alami untuk mengendalikan penyakit akibat jamur patogen pada tanaman stroberi secara berkelanjutan dan ramah lingkungan.



Gambar 1.3. Kerangka konsep penelitian

1.9 Hipotesis Penelitian

1. Dari akar tanaman stroberi dapat diisolasi beberapa jenis bakteri endofit yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim kitinase.
2. Bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman stroberi memiliki aktivitas enzim kitinase dengan karakteristik biokimiawi tertentu, seperti pH dan suhu optimum yang sesuai untuk menghidrolisis kitin sebagai komponen utama dinding sel jamur patogen, serta menunjukkan stabilitas aktivitas enzim pada kondisi tertentu secara *in vitro*.

Analisis aktivitas bakteri endofit akar stroberi yang berpotensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dapat dilakukan melalui pengujian aktivitas enzim kitinase serta uji pendukung lainnya, yaitu produksi HCN, siderofor, dan senyawa volatil. Aktivitas tersebut berperan secara simbiosis dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *Fusarium* sp., sehingga menunjukkan potensi bakteri endofit sebagai agen biokontrol yang efektif untuk pengembangan biopestisida alami.



BAB II

TOPIK PENELITIAN 1

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI AKAR TANAMAN STROBERI PENGHASIL KITINASE

2.1 Abstrak

Latar belakang, bakteri endofitik merupakan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek merugikan, dan memiliki potensi besar dalam bidang bioteknologi, salah satunya sebagai penghasil enzim kitinase. **Tujuan**, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan mengidentifikasi bakteri endofitik dari akar tanaman stroberi (*Fragaria* spp.) yang berpotensi menghasilkan enzim kitinase. **Metode**, sampel akar diambil dari tanaman stroberi sehat, kemudian dilakukan proses sterilisasi permukaan dan pengenceran bertingkat sebelum ditanam pada media selektif yang mengandung substrat koloidal kitin. Isolat yang diperoleh diuji aktivitas kitinasenya secara kualitatif berdasarkan pembentukan zona bening di sekitar koloni dan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri. **Hasil**, skrining awal menunjukkan empat isolat bakteri endofitik, yang diberi nama isolat RS-A1, RS-A2, RS-A3, dan RS-A4. Dua isolat di antaranya, yaitu RS-A1 dan RS-A2, menunjukkan indeks kitinolitik (IK) tertinggi. Hasil uji kualitatif isolat RS-A1 memiliki IK (1,65 cm) dan isolate RS-A2 IK (1,55 cm). Hasil kuantitatif aktivitas spesifik enzim kitinase yang tinggi dimiliki oleh isolate RS-A2 sebesar 0,01146 U/mg sedangkan untuk isolat RS-A1 sebesar 0,00781 U/mg. Kedua isolat tersebut kemudian dikarakterisasi secara morfologis dan diidentifikasi secara molekuler melalui gen 16S rRNA. Hasil analisis BLAST pada GenBank menunjukkan bahwa isolat RS-A1 memiliki tingkat kesamaan 98,06% dengan *Acinetobacter baumannii*, sedangkan isolat RS-A2 memiliki tingkat kesamaan 97,21% dengan *Bacillus aerius*. **Kesimpulan**, berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa akar tanaman stroberi mengandung bakteri endofitik yang berpotensi sebagai penghasil enzim kitinase dan dapat dikembangkan sebagai agen biokontrol ramah lingkungan dalam mengendalikan patogen tanaman.

2.2 Pendahuluan

Salah satu tantangan terbesar dalam pertanian saat ini adalah menemukan cara untuk meningkatkan produktivitas tanaman tanpa mengorbankan kualitas hasil pertanian akibat serangan patogen. Penggunaan pestisida sintetik masih menjadi pilihan utama dalam pertanian modern untuk mengatasi masalah penyakit tanaman. Namun, penggunaan pestisida sintetik memiliki efek samping terhadap kesehatan manusia, seperti meningkatkan stres oksidatif, mengganggu sistem endokrin, serta memodulasi ekspresi gen yang dapat memicu berbagai masalah kesehatan, (hekhari et al., 2024). Selain itu, penggunaan pestisida sintetik juga terhadap lingkungan, seperti pencemaran tanah dan udara yang mengganggu keseimbangan ekosistem (Kashyap et al., 2024). Kondisi ini perlunya solusi alternatif yang ramah lingkungan dan dapat mengendalikan penyakit tanaman.



Salah satu pendekatan yang menjanjikan dalam pertanian berkelanjutan adalah pemanfaatan bakteri endofit sebagai agen pengendali hayati. Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang hidup secara simbiosis di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek patogenik bagi inangnya. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit memiliki potensi besar sebagai biofungisida, pupuk hayati, serta biostimulator dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap stres biotik dan abiotik (Tu et al., 2024). Penelitian yang dilakukan oleh (Sriwati et al., 2023) melaporkan bahwa bakteri endofit dari tanaman tomat memiliki potensi sebagai agen biokontrol karena mampu menghasilkan metabolit sekunder dan enzim hidrolitik, termasuk enzim kitinase, yang berperan dalam aktivitas antijamur dan mendorong pertumbuhan tanaman.

Enzim kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi monomer glukosamin. Kitin merupakan komponen utama dinding sel jamur (Schiphof et al., 2024). Oleh karena itu, dalam konteks pengendalian penyakit tanaman, enzim kitinase berfungsi sebagai agen antijamur dengan cara mendegradasi struktur dinding sel jamur patogen. Enzim ini ditemukan pada berbagai organisme seperti bakteri, jamur, tanaman, dan hewan, serta berperan penting dalam mekanisme perlindungan alami tanaman terhadap infeksi patogen (J. M. Ferreira et al., 2023; Rathod et al., 2023; Yunita et al., 2024). Dengan demikian, bakteri endofit penghasil kitinase memiliki potensi ganda, yaitu melindungi tanaman dari serangan patogen sekaligus meningkatkan daya tahan dan pertumbuhannya.

Tanaman stroberi (*Fragaria* sp.) merupakan komoditas hortikultura bernilai ekonomi tinggi yang banyak digemari masyarakat karena rasanya yang khas dan kandungan nutrisinya yang tinggi, termasuk senyawa fenolik, vitamin C, dan senyawa antioksidan (Manda-Hakki & Hassanpour, 2024; L. Xu et al., 2025). Namun demikian, stroberi dikenal sangat rentan terhadap serangan jamur patogen, seperti *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, dan *Botrytis cinerea*, yang dapat menyebabkan penurunan kualitas dan produktivitas tanaman. Penelitian sebelumnya oleh (Abdelhadi et al., 2024) melaporkan bahwa akar tanaman stroberi dapat menjadi habitat bagi bakteri endofit yang memiliki kemampuan antijamur, sehingga menjadikannya subjek penelitian yang menarik untuk dieksplorasi lebih lanjut.

Meskipun demikian, penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi bakteri endofit penghasil kitinase dari akar tanaman stroberi masih sangat terbatas, khususnya dari varietas yang dibudidayakan di Indonesia. Padahal, eksplorasi mikroba lokal penting dilakukan untuk menemukan isolat yang adaptif terhadap kondisi lingkungan setempat dan efektif sebagai agen biokontrol alami. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan mengidentifikasi bakteri endofit dari akar tanaman stroberi yang mampu menghasilkan enzim kitinase. Penelitian ini



memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan bioteknologi pangan melalui pemanfaatan mikroorganisme endofitik sebagai pestisida sintetik. Selain itu, hasil penelitian ini dapat menjadi bagian dari pengembangan agen biokontrol alami yang efektif, ramah lingkungan, dan berkelanjutan.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar tanaman stroberi dari daerah Malino, Kabupaten Gowa, Indonesia, koloidal kitin sebagai substrat enzim, akuades, yeast extract, bacto agar, bacto peptone, peptone, Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck Millipore), Aqua Pro Injection, NaOH (Merck Millipore), HCl (Merck Millipore), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaH_2PO_4 , Na_2CO_3 , K_2HPO_4 , NaCl, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, N-acetyl-glucosamine (Sigma-Aldrich), Schales reagent.

Alat yang digunakan meliputi Laminar Air Flows Cabinets (LAFC) (model JSCB-900SB), analytical balance (Ohaus), sentrifuge (Hermle), autoclave (model 8000-DSE Napco), shaker water bath (Mettler), perangkat elektroforesis gel (Bio-Rad), spectrophotometer UV-Vis (Genesys 20), vibrating platform shaker (Heidolph model Titramax 1000), Polymerase Chain Reaction (PCR) machine (Bio-Rad), laboratory glassware (Pyrex), refrigerator (Toshiba).

2.3.2 Prosedur Penelitian

Persiapan sampel akar tanaman stroberi. Akar stroberi pertama-tama dicuci dengan air sebelum diisolasi untuk menghilangkan kotoran seperti tanah yang menempel pada permukaan, kemudian dibilas dengan air suling. Akar tanaman dipotong menjadi segmen-segmen sepanjang 0,5–1 cm untuk memungkinkan akses ke jaringan akar bagian dalam. Permukaan akar disterilkan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Sterilisasi permukaan akar menggunakan larutan desinfektan seperti alkohol 70%, larutan natrium hipoklorit 1%, dan air setara injeksi bertujuan untuk membersihkan atau menghilangkan kontaminasi dari lingkungan eksternal jaringan akar.

Isolasi bakteri endofit dari akar stroberi. Isolasi bakteri endofit dilakukan menggunakan akar tanaman stroberi yang dicuci dengan air suling. Akar stroberi dipotong 0,5 cm kemudian diinjeksikan pada media Nutrient Broth (NB) kemudian dishaker selama 12 jam dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 37 °C. Akar stroberi kemudian dihaluskan dengan dilakukan penambahan 3 mL aqua pro injection dan dimasukkan ke dalam NB steril dan diinkubasi goyang selama 2 jam. Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL NB. Dilakukan pengenceran berseri hingga tingkat pengenceran 10^{-8} . Setelah dilakukan pengenceran, diambil 0,1 ml dari pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-8} kemudian ditumbuhkan pada media Nutrient Agar (NA) yang sudah ditambahkan L-triptofan sebanyak 0,1% (Raut et al., 2017). Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C.



ia bening bakteri. Skrining bakteri penghasil kitinase dapat menggunakan media agar yang mengandung koloidal kitin. Isolat media yang mengandung: 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% KH_2PO_4 ; 0,03 % NaCl, 0,5 g ekstrak ragi, 15 g agar, 1% kitin koloid, kemudian 7 dan suhu 37 °C selama 72 jam. Koloni yang menunjukkan zona

bening di sekeliling bakteri yang menandakan adanya bakteri penghasil kitinase (Kurniawan et al., 2019).

Identifikasi bakteri. Kultur isolat bakteri terpilih diidentifikasi berdasarkan morfologi koloninya (warna, bentuk, tepi elevasi, dan pigmentasi) dan pengamatan mikroskop (susunan sel dan pewarnaan gram). Selain itu, identifikasi bakteri juga dilakukan dengan perbesaran 16s rRNA (Bahmani et al., 2021).

Penentuan kurva pertumbuhan bakteri kitinolitik. Kurva pertumbuhan bakteri kitinolitik dilakukan dengan mengukur pertumbuhan bakteri setiap 12 jam. Isolat yang dipilih diinokulasikan ke dalam 20 mL media inokulum. Media Luria Broth disiapkan dengan mencampur 10 g triptone, 10 g ekstrak ragi, 0,1 g NaCl, dan 1000 mL air suling. Media kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam sambil dikocok pada 150 rpm. Sebanyak 2 mL larutan inokulum ditambahkan ke 20 mL media yang sama dalam labu erlenmeyer 100 mL dan diinkubasi dalam kondisi yang sama. Kemudian, sampel sebanyak 2 mL diambil setiap 2 jam untuk mengukur kerapatan optik (OD) bakteri hingga fase kematian awal. Pengukuran OD bakteri dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan memplot waktu inkubasi terhadap kerapatan optik (Sudin et al., 2020).

Produksi enzim kitinase dari akar tanaman stroberi. Persiapan inokulum. Dilakukan dengan satu ose isolat terpilih diinokulasikan ke dalam media inokulum dan diinkubasi pada pengocok putar pada kecepatan 180 rpm pada suhu 24 °C selama 24 jam untuk menyiapkan kultur benih yang digunakan untuk produksi enzim (Madonna, 2014). Produksi enzim kitinase dilakukan sebanyak 15 mL media inokulum dipipet dan dipindahkan ke dalam media produksi, kemudian diaduk kembali menggunakan shaker dengan kecepatan 180 rpm selama 72 jam. Selanjutnya, endapan dan supernatan dipisahkan menggunakan sentrifus berpendingin dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dikumpulkan sebagai ekstrak kasar enzim kitinase, dipindahkan ke dalam botol, dan disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan pada tahap berikutnya, sementara endapan (residu) dibuang. Ekstrak kasar enzim kemudian dianalisis untuk menentukan menggunakan metode Schales, yang mengukur jumlah N-asetilglukosamin (NAG) yang dilepaskan dari koloidal kitin sebagai substrat. Selain itu, konsentrasi protein ekstrak ditentukan menggunakan metode Lowry (Natsir et al., 2010).

Pengukuran aktivitas kitinase. Prinsip pengukuran aktivitas kitinase didasarkan pada kuantifikasi gula pereduksi yang dilepaskan dari hidrolisis kitin koloid. Campuran reaksi terdiri dari 50 µL ekstrak enzim, 100 µL koloidal kitin, dan 150 µL larutan natrium fosfat, yang dicampur dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit. Dari campuran yang dihasilkan, 400 µL dipindahkan ke diikuti dengan penambahan 1600 µL air suling dan 2 mL reagen reaksi ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 5 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 420 nm menggunakan



spektrofotometer UV-VIS. Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan ditentukan menggunakan N-asetilglukosamin (GlcNAc) sebagai standar. Satu unit (U) aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol N-asetilglukosamin per menit dalam kondisi pengujian (Natsir et al., 2010). Aktivitas enzim kitinase dapat diketahui dengan menggunakan rumus pada persamaan 2.1.

$$\text{Aktivitas enzim} = [X_s - X_k] = \frac{1000}{200} \times \frac{600}{200} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{BM} \quad (2.1)$$

Keterangan:

- X_s = Kadar glukosamin pada sampel ($\mu\text{g/mL}$)
- X_k = Kadar glukosamin pada kontrol ($\mu\text{g/mL}$)
- 1000 = faktor koreksi ($1 = 1000 \mu\text{L}$ (p))
- 200 = volume enzim (μL) (w)
- 600 = volume total reaksi enzimatis (μL) (x)
- 400 = volume campuran sampel yang digunakan untuk pewarnaan (μL) (y)
- 30 = waktu inkubasi
- BM = BM N-asetilglukosamin (221,2 g/mol)

Penentuan kadar protein dengan metode Lowry (Purwanto, 2014). Sebanyak 1 mL larutan enzim, 1 mL larutan standar, 1 mL akuades dimasukkan masing-masing dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2,5 mL larutan Lowry B, dihomogenkan lalu didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,25 mL Lowry A dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 30 menit dengan sesekali dikocok, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 670 nm. Kadar protein enzim kitinase dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (2). Kadar protein enzim kitinase diperoleh dalam satuan mg/mL menggunakan persamaan rumus pada persamaan 2.2.

$$\text{Kadar protein} = X \times \text{FP} \quad (2.2)$$

Keterangan:

- X = Absorbansi (nm)
- FP = Faktor pengenceran

2.4 Hasil dan Pembahasan

2.4.1 Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Stroberi (*Fragaria* sp.)

Bakteri endofit merupakan jenis bakteri yang mampu hidup di dalam jaringan tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri endofit yang terdapat pada jaringan akar. Sampel diambil dari akar tanaman stroberi (*Fragaria* sp.) yang tumbuh di Malino, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan. Akar stroberi terlebih



an air sebelum dilakukan isolasi untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat pada permukaannya dan selanjutnya dicuci. Akar tanaman dipotong sepanjang 0,5-1 cm agar membuka akses akar. Sterilisasi permukaan akar dengan menggunakan larutan alkohol 70%, cairan hipoklorit 1% dan aqua pro injeksi bertujuan

sebagai dekontaminasi atau menghilangkan kontaminasi dari lingkungan luar jaringan akar.

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode sebar (*spread plate*), yaitu dengan cara menghaluskan akar stroberi bersama 2 mL akuades steril. Proses selanjutnya adalah dibuat beberapa tingkat pengenceran menggunakan akuades pro injection. Setiap hasil pengenceran kemudian disuspensikan ke dalam media Luria Broth (LB) dan diinkubasi menggunakan shaker selama 24 jam. Setelah proses inkubasi, suspensi tersebut ditanam pada media padat Luria Agar (LA). Koloni bakteri yang tumbuh dengan karakteristik berbeda kemudian dimurnikan menggunakan teknik streak pada cawan petri berisi media padat. Hasil isolat bakteri endofit yang tumbuh diperoleh sebanyak 4 isolat bakteri endofit yang diberi kode RS-A1, RS-A2, RS-A3, dan RS-A4.

2.4.2 Skrining Bakteri Kitinolitik

Skrining isolat bakteri dilakukan menggunakan media selektif yang mengandung koloidal kitin sebagai substrat. Pengujian aktivitas kitinolitik dilakukan melalui pengamatan terbentuknya zona bening di sekitar koloni pada keempat isolat bakteri yang diuji. Zona bening yang terbentuk disebabkan oleh aktivitas enzim kitinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri dan menghidrolisis makromolekul kitin menjadi molekul-molekul berukuran lebih kecil atau monomer N-asetil-D-glukosamin (Nafiah et al., 2017). Hasil skrining indeks kitinolitik dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Hasil skrining indeks kitinolitik (dalam cm)

Nama Isolat	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4
RS-A1	1,1	1,4	1,45	1,65
RS-A2	0,9	1,3	1,4	1,55
RS-A3	0,85	1,15	1,25	1,4
RS-A4	0,9	1,25	1,25	1,35

Indeks kitinolitik adalah suatu ukuran kuantitatif yang digunakan untuk mengukur kemampuan suatu mikroorganisme dalam mendegradasi kitin. Nilai indeks kitinolitik diperoleh dari perbandingan antara diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri pada media yang mengandung kitin dengan diameter koloni bakteri itu sendiri. Indeks kitinolitik dari masing-masing isolat bakteri berbeda-beda, yang paling tinggi diperoleh dari isolat RS-A1 yaitu 1,65 sedangkan yang paling rendah diperoleh dari isolat RS-A4 yaitu 1,35. Setiap isolat menghasilkan indeks kitinolitik yang berbeda-beda, dipengaruhi oleh jumlah monomer N-asetil-D-glukosamin yang dihasilkan sehingga variasi jumlah monomer tersebut berperan dalam menentukan



ang terbentuk di sekitar koloni (Giyanto et al., 2025).
memiliki indeks kitinolitik yang tertinggi yakni isolat RS-A1 dan ke tahap produksi enzim kitinase. Hal ini dikarenakan semakin kitinolitik maka semakin besar pula aktivitas enzim kitinase yang alat tersebut. Perbedaan nilai indeks kitinolitik juga dapat beberapa factor yang dapat memengaruhi aktivitas enzim kitinase

yaitu suhu, pH, jenis substrat, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi (Wahyudi et al., 2021). Penelitian sebelumnya oleh (Chanifah et al., 2025) menyatakan bahwa aktivitas kitinase juga dapat dipengaruhi oleh pH koloid kitin yang tidak sesuai dan adanya kontaminan yang membuat aktivitas kitinase tidak optimal.

2.4.3 Karakterisasi Morfologi dan Molekuler 16S rRNA Isolat Bakteri RS-A1 dan RS-A2

Karakterisasi morfologi dan molekuler merupakan suatu langkah penting untuk memahami ciri-ciri dan identitas isolat bakteri RS-A1 dan RS-A2 secara menyeluruh. Karakterisasi morfologi dilakukan untuk mengamati ciri-ciri koloni dan sel bakteri, seperti bentuk, ukuran, warna, serta reaksi pewarnaan gram, yang berfungsi sebagai indikator awal dalam mengelompokkan isolat. Analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA dilakukan untuk memperoleh informasi genetik yang lebih akurat dan menentukan hubungan kekerabatan dengan bakteri lain. Pendekatan gabungan ini memberikan gambaran yang menyeluruh sehingga hasil identifikasi isolat bakteri dapat lebih valid.

Karakterisasi morfologi. Pengamatan secara mikroskopis dan fisiologis memperlihatkan adanya variasi morfologi seperti bentuk dan karakteristik dari isolat bakteri yang diamati. Hasil pengamatan secara morfologi dapat dilihat pada Tabel 2.2. Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis menunjukkan bahwa isolat RS-A1 memiliki bentuk koloni bulat halus berwarna putih kekuningan dengan tepian rata dan elevasi cembung. Isolat RS-A2 secara makroskopis memiliki bentuk koloni bulat tidak beraturan, berwarna putih, dengan tepian yang bergelombang dan elevasi cembung. Perbedaan bentuk morfologi pada koloni isolat bakteri dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan atau dalam hal ini kemampuan spesies bakteri yang berbeda dalam melakukan proses metabolisme komponen media kultur yang berbeda (Alifianto et al., 2025).

Tabel 2.2. Karakterisasi morfologi isolat bakteri dari akar tanaman stroberi (*Fragaria* sp.)

Pengamatan Morfologi Bakteri	Isolat RS-A1	Isolat RS-A2
Bentuk koloni	Bulat halus	Bulat tidak beraturan
Warna	Putih kekuningan	Putih
Tepian	Rata	Bergelombang
Elevasi	Cembung	Cembung
Bentuk sel	Basillkokus	Basil
Pewarnaan Gram	Negatif	Positif



a mikroskopis juga dilakukan untuk mengetahui morfologi sel dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat RS-A1 memiliki sedangkan RS-A2 berbentuk basil. Perbedaan morfologi ini ifat genetik dari masing-masing isolat. Pewarnaan gram juga nelengkapi hasil karakterisasi isolat uji. Pewarnaan gram etode lama yang dikembangkan namun masih banyak digunakan

dalam bakteriologi karena dianggap prosedurnya relative sederhana dan cepat untuk membedakan bakteri gram positif maupun gram negative dengan menggunakan larutan pewarna yang berbeda (Paray et al., 2023). Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat bakteri RS-A1 merupakan bakteri gram negative sedangkan isolat RS-A2 adalah bakteri gram positif. Hal ini ditandai dengan warna ungu merah muda pada isolat RS-A1 dan warna ungu pada isolat RS-A2 setelah dilakukan pewarnaan. Penelitian yang dilakukan oleh (Emitaro et al., 2024) menjelaskan variasi warna yang muncul pada sel bakteri setelah proses pewarnaan terjadi karena adanya perbedaan struktur penyusun dinding sel bakteri tersebut.

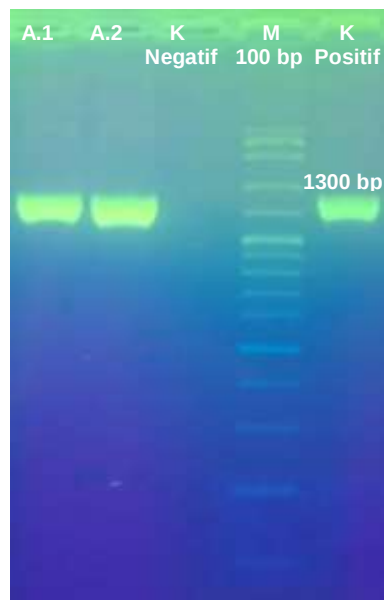
Bakteri gram-negatif memiliki dinding sel yang didominasi oleh lapisan lipid. Hal ini menyebabkan bakteri ini tidak mampu menahan zat warna utama ketika dilakukan proses pewarnaan, terutama setelah tahap pencucian dengan alkohol yang dapat merusak lapisan lipid tersebut. Akibatnya, pada proses pewarnaan gram, bakteri ini akan tampak berwarna merah atau merah muda (Dwiyanti et al., 2025). Bakteri gram-positif akan tampak berwarna ungu setelah proses pewarnaan gram karena mampu mempertahankan zat warna utama, yaitu kristal violet meskipun mengalami proses pencucian dengan alkohol. Hal ini disebabkan oleh struktur dinding sel yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, sehingga kristal violet tetap terikat kuat dan tidak tergantikan oleh zat pewarna sekunder seperti safranin (Chanifah et al., 2025).

Karakterisasi molekuler 16S rRNA. Karakterisasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan bakteri secara akurat melalui analisis urutan basa pada gen tersebut. Gen 16S rRNA banyak digunakan karena memiliki sifat yang konservatif sehingga dapat menjadi penanda universal, namun juga mengandung daerah variabel yang memungkinkan diferensiasi antar spesies, sehingga memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dalam identifikasi bakteri. Gen 16S rRNA terbukti sangat efektif digunakan dalam identifikasi bakteri karena memiliki tingkat akurasi yang tinggi dan proses analisisnya relatif cepat dibandingkan metode konvensional. Hal ini menjadikannya sebagai salah satu metode yang banyak dipilih untuk klasifikasi molekuler. Hasil elektroforesis gel amplifikasi gen 16S rRNA disajikan pada Gambar 2.1. Hasil analisis molekuler berbasis gen 16S rRNA yang tingkat kemiripan urutan basa sebesar 97% umumnya menunjukkan kesamaan pada tingkat genus, sedangkan tingkat kemiripan sekitar 99% atau lebih dapat menunjukkan kesamaan pada tingkat spesies (Akihary & Kolondam, 2020).

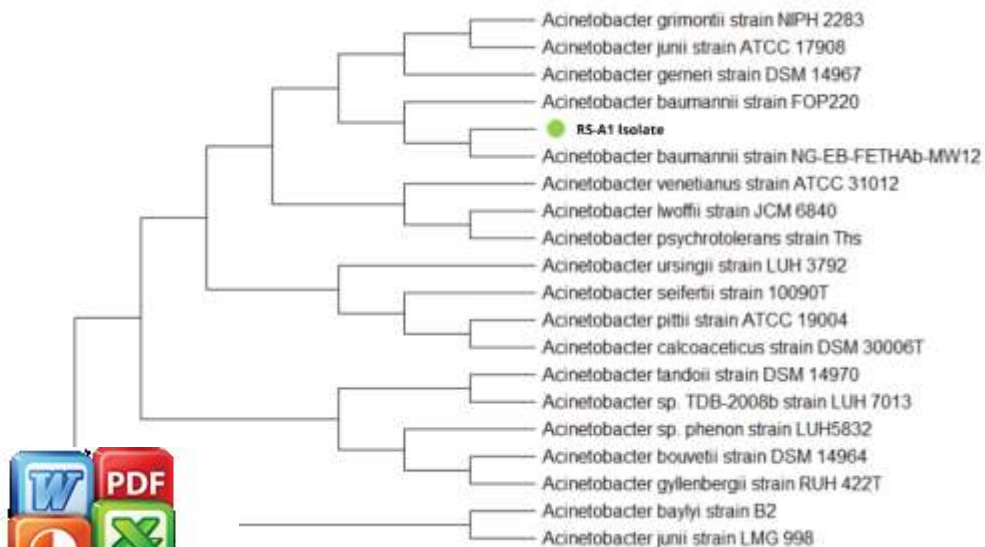
Data hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan program BLAST-N melalui basis data nukleotida NCBI untuk menentukan tingkat kesesuaian urutan (*sequence similarity*) dan memprediksi kemungkinan genus dari masing-masing sekuens (*alignment*) untuk isolat RS-A1 dan RS-A2. Hasil analisis disajikan pada Tabel 2.1, yang selanjutnya digunakan sebagai dasar dalam analisis filogenetik. Pohon filogenetik yang disajikan pada Gambar 2.2 menunjukkan hasil analisis BLAST yang diperoleh dari sekuens RNA dari isolat RS-A1 memiliki kemiripan sebesar 98,06% dengan



Acinetobacter baumannii dan isolat RS-A2 memiliki kemiripan sebesar 97,21% dengan *Bacillus aerius*.

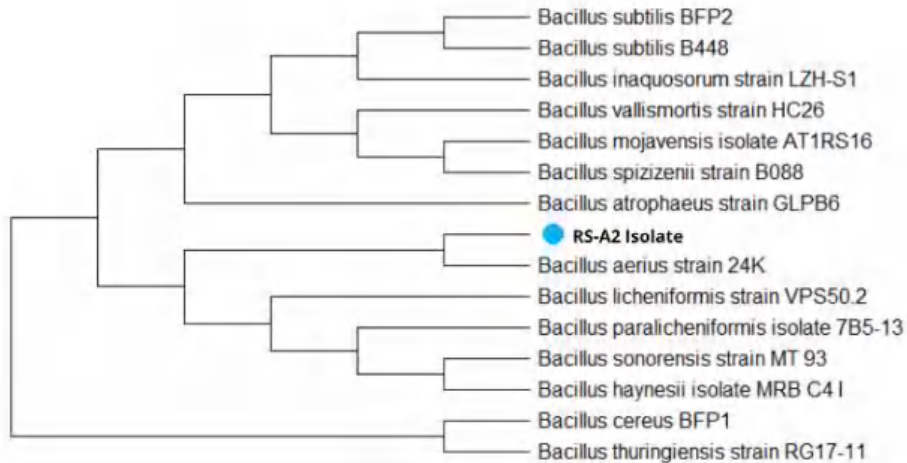


Gambar 2.1. Hasil elektroforesis gel amplifikasi gen 16S rRNA. Lajur A.1 dan A.2 menunjukkan pita DNA pada ukuran sekitar ± 1300 bp yang sesuai dengan target gen 16S rRNA. M: DNA ladder 100 bp; K negatif: kontrol negatif; K positif: kontrol positif.



on filogenetik isolat RS-A1 yang diperoleh dari database NCBI berdasarkan urutan gen 16S rRNA





Gambar 2.3. Pohon filogenetik isolat RS-A2 yang diperoleh dari database NCBI berdasarkan urutan gen 16S rRNA

Tabel 2.3. Hasil BLAST *alignment* sekuens 16S rRNA dari isolat bakteri endofit

Kode Isolat	Kecocokan Terdekat	Kesamaan (%)	Nomor Akses	Cakupan Kueri (%)	Nilai-E
RS-A1	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5689	98,06%	CP096731.1	97%	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain ATCC BAA1605	98,06%	CP058625.1	97%	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 2018HLJAB1	98,06%	CP059358.1	97%	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain VB958	98,06%	CP040041.1	97%	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain Aci44	97,98%	CP101653.1	97%	0.0
	<i>Bacillus sonorensis</i> strain ONF1P	97.21%	KT362744.1	97%	0.0
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain S1	97.57%	KP342533.1	95%	0.0
	<i>Bacillus</i> sp. (in: ia) strain S45	97.06%	MH819973.1	96%	0.0
	<i>Bacillus</i> sp. (in: ia) strain S45	97.06%	MH819973.1	96%	0.0
	<i>Bacillus</i> sp. (in: ia) strain S45	97.06%	MH819973.1	96%	0.0
RS-A2	<i>Bacillus</i> sp. (in: ia) strain S45	97.06%	MH819973.1	96%	0.0
	<i>Bacillus</i> sp. (in: ia) strain S45	97.06%	MH819973.1	96%	0.0



2.4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Acinetobacter baumannii* dan *Bacillus aerius*

Isolat bakteri *Acinetobacter baumannii* RS-A1 dan *Bacillus aerius* RS-A2 kemudian ditumbuhkan pada media produksi dengan kondisi inkubasi 37°C pada kecepatan 180 rpm selama 3 hari. Pengambilan sampel dilakukan secara berkala setiap 6 jam untuk memantau pertumbuhan mikroba melalui pengukuran *Optical Density* (OD), uji aktivitas enzim, serta analisis kadar protein. Pengukuran OD dilakukan pada panjang gelombang 660 nm. Kurva pertumbuhan bakteri ditampilkan pada Gambar 2.4 dan Gambar 2.5.

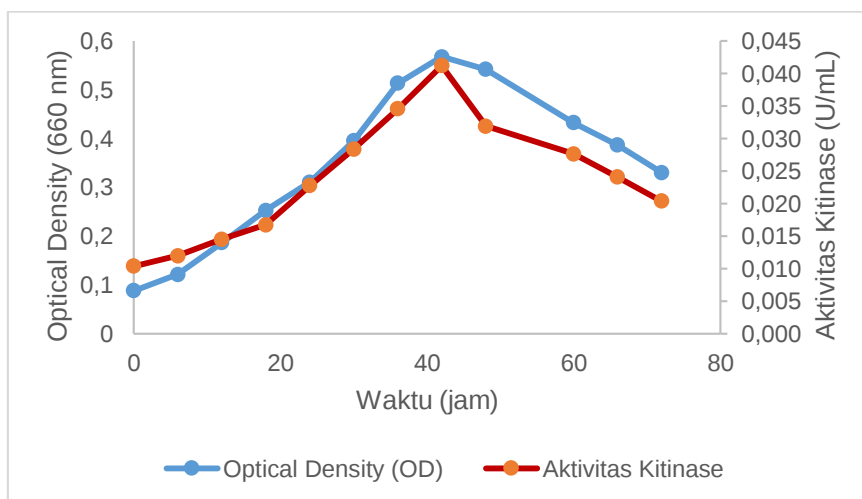
Penelitian oleh Fernández-Martínez et al. (2024) menjelaskan bahwa kurva pertumbuhan bakteri terdiri atas 4 fase yaitu fase adaptasi (lag), eksponensial (log), stasioner, dan fase kematian. Hasil penelitian pada Gambar 2.4 menunjukkan pertumbuhan bakteri isolat RS-A1 mengalami fase lag atau fase adaptasi pada awal pengkondisian waktu yaitu jam ke-0 hingga jam ke-6. Bakteri belum tumbuh secara aktif karena masih beradaptasi dengan lingkungan media. Fase lag ini terjadi ketika OD mulai naik sedikit tapi belum signifikan. Fase log atau eksponensial terjadi pada jam ke-6-42 jam. Fase eksponensial ditandai dengan bakteri tumbuh dan membelah diri dengan cepat sehingga OD meningkat cepat dan tajam. Fase stasioner pada grafik ini ditandai dengan OD mencapai puncak dan mulai stabil atau sedikit menurun. Fase ini terjadi pada jam ke-42 jam sebagai titik kritis dimulainya fase stasioner. Berdasarkan data yang disajikan, fase stasioner terjadi sangat singkat, ditandai oleh tercapainya titik OD maksimum pada 42 jam. Fase kematian ditandai dengan OD menurun terus-menerus dikarenakan sel bakteri banyak yang mati. Fase kematian ini mulai terjadi pada jam ke-42-72, hal ini terjadi karena jumlah substrat dan nutrisi hampir habis, sehingga sel semakin lama sudah tidak dapat tumbuh lagi.

Hasil kurva pertumbuhan bakteri isolat RS-A2 pada Gambar 2.5 menunjukkan pertumbuhan bakteri pada fase lag yang tidak biasanya. Fase lag idealnya adalah periode untuk adaptasi pada awal pengkondisian tanpa peningkatan biomassa yang signifikan. Namun, OD awal yang tinggi pada kurva yaitu 0,87 pada 0 jam dan segera meningkat menjadi 1,14 pada 6 jam mengindikasikan bahwa inoculum yang digunakan sudah berada dalam kondisi metabolik aktif. Hal ini juga dilaporkan oleh (Madar et al., 2013) bahwa fase lag yang sangat singkat ditemukan pada media segar dimana sel-sel telah mengekspresikan gen-gen sehingga siap untuk tumbuh. Fase lag terjadi singkat yaitu jam pada jam ke-0 hingga jam ke-6. Meskipun nilai OD telah meningkat dari 0,87 menjadi 1,14, peningkatan ini masih lambat dibandingkan dengan fase pertumbuhan berikutnya.

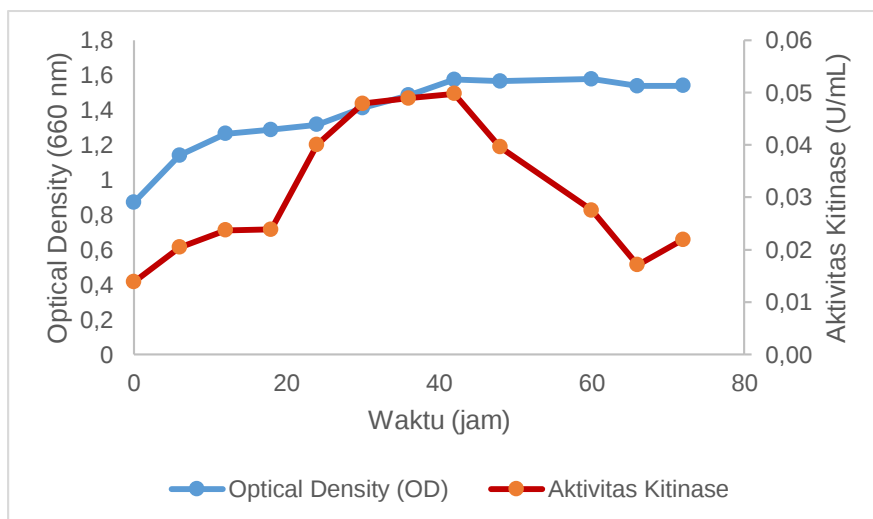
Fase log atau eksponensial terjadi pada jam ke-6-42 jam. Fase eksponensial ditandai dengan bakteri tumbuh dan membelah diri dengan cepat sehingga OD meningkat dengan tajam. Pertumbuhan *Bacillus aerius* RS-A2 dengan titik puncak OD pada jam ke-42, diikuti fase stasioner ditandai dengan OD mulai stabil atau sedikit menurun. Fase ini terjadi pada jam ke-42 jam awal yang landai ini belum dapat diklasifikasikan sebagai fase stasioner ditandai dengan OD menurun secara tajam dikarenakan sel bakteri Jam ke-72 lebih tepat didefinisikan sebagai fase stasioner akhir



yang mengarah ke kematian sel. Diperlukan pengambilan sampel data yang lebih lama untuk mengamati penurunan kematian yang jelas.



Gambar 2.4. Hubungan antara kurva pertumbuhan bakteri RS-A1 (OD_{600}) dan aktivitas enzim kitinase terhadap waktu inkubasi. Nilai OD_{600} ditampilkan pada sumbu Y kiri sebagai indikator pertumbuhan sel, sedangkan aktivitas enzim (U/mL) ditampilkan pada sumbu Y kanan.



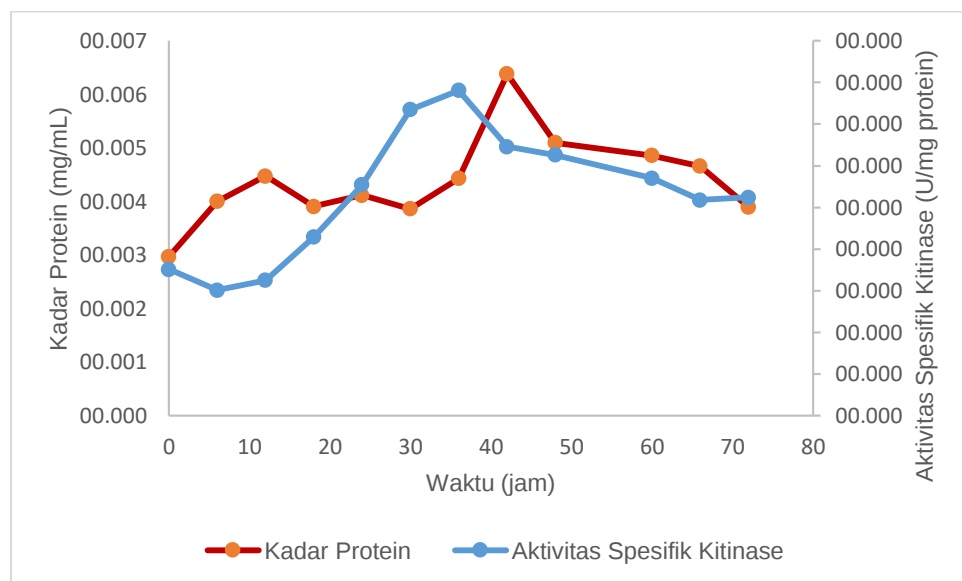
Gambar 2.5. Hubungan antara kurva pertumbuhan bakteri RS-A2 (OD_{600}) dan aktivitas enzim kitinase terhadap waktu inkubasi. Nilai OD_{600} ditampilkan pada sumbu Y kiri sebagai indikator pertumbuhan sel, sedangkan aktivitas enzim (U/mL) ditampilkan pada sumbu Y kanan.



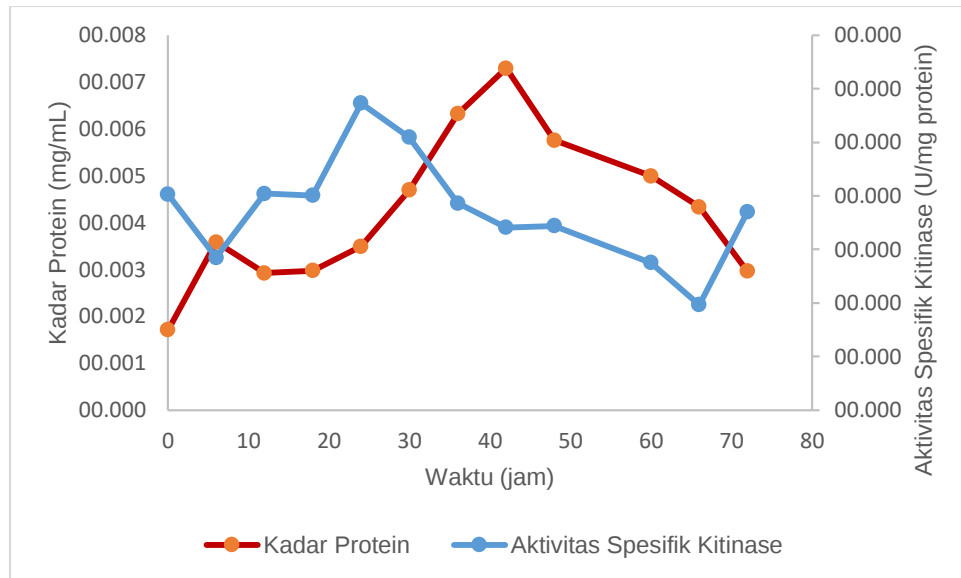
2.4.5 Aktivitas Enzim Kitinase Bakteri *Acinetobacter baumannii* dan *Bacillus aerius*

Hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim kitinase yang dibandingkan dengan kurva pertumbuhan dua isolat bakteri endofit, yaitu RS-A1 dan RS-A2, ditunjukkan grafik pada Gambar 2.6 dan 2.7. Berdasarkan kedua grafik perbandingan kurva pertumbuhan dan aktivitas spesifik enzim kitinase dari kedua isolat bakteri menunjukkan adanya pola hubungan antara fase pertumbuhan sel dengan produksi enzim. Pada isolat RS-A1, aktivitas spesifik enzim kitinase mencapai nilai maksimum pada jam ke-36, sedangkan pertumbuhan bakteri mencapai fase stasioner pada jam ke-42. Isolat RS-A2, aktivitas kitinase meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi dan mencapai puncak pada fase awal logaritmik yaitu pada jam ke-24 sebelum akhirnya menurun saat memasuki fase stasioner.

Kedua hasil tersebut menunjukkan bahwa produksi enzim kitinase oleh bakteri endofit dari akar tanaman stroberi bersifat *growth-associated*, yaitu aktivitas enzim meningkat bersamaan dengan fase pertumbuhan logaritmik. Selama fase ini, bakteri mengalami pembelahan aktif dan membutuhkan suplai energi serta sumber karbon yang tinggi. Untuk memenuhi kebutuhan tersebut, bakteri mensekresikan enzim kitinase secara ekstraseluler guna menghidrolisis kitin di medium menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti N-asetilglukosamin, yang kemudian digunakan sebagai sumber karbon bagi metabolisme sel.



aktivitas spesifik kitinase dan kadar protein isolat bakteri RS-A1 *inetobacter baumannii* terhadap waktu inkubasi.



Gambar 2.7. Profil aktivitas spesifik kitinase dan kadar protein isolat bakteri RS-A2 *Bacillus aerius* terhadap waktu inkubasi.

Penurunan aktivitas enzim setelah fase logaritmik pada kedua isolat kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, seperti menurunnya ketersediaan substrat kitin, akumulasi metabolit yang bersifat menghambat aktivitas enzim, serta perubahan kondisi fisiologis sel pada fase stasioner yang tidak lagi mendukung biosintesis protein enzimatis (Elawati et al., 2018). Fenomena ini juga menunjukkan bahwa produksi enzim tidak berlangsung secara terus-menerus, melainkan bergantung pada kondisi fisiologi dan kebutuhan metabolik bakteri. Hasil penelitian ini sejalan dengan temuan (Khairah et al., 2023) yang melaporkan bahwa aktivitas spesifik enzim kitinase pada *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 mencapai maksimum pada fase logaritmik dan menurun setelah memasuki fase stasioner.

Aktivitas spesifik enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofit pada penelitian ini menunjukkan nilai sebesar 0,00781 U/mg untuk RS-A1 dan 0,01146 U/mg untuk RS-A2. Nilai ini mengindikasikan kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat kitin per satuan massa protein. Aktivitas spesifik yang diperoleh ini jika dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh (Hassan et al., 2021) diketahui bahwa nilai aktivitas spesifik enzim kitinase yang dihasilkan bakteri endofit *Bacillus safensis* dari buah stroberi yaitu adalah 0,00966 U/mg. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan nilai isolat RS-A1 dan lebih rendah dari isolat RS-A2. Bakteri endofit *Pseudomonas aeruginosa* dari akar tanaman bawang juga aktivitas spesifik enzim kitinase senilai 0,00566 U/mg (Khairah et al., 2023) juga lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil aktivitas spesifik enzim kitinase isolat RS-A1 dan RS-A2.



aktivitas spesifik kitinase pada setiap isolat dapat dipengaruhi oleh seperti kondisi pH dan suhu selama pertumbuhan bakteri yang dalam menjaga stabilitas dan kinerja enzim, sebagaimana

dilaporkan oleh (Harvinda et al., 2023) yang menunjukkan bahwa kitinase bekerja optimal pada kondisi lingkungan tertentu. Konsentrasi substrat kitin dalam media juga dapat meningkatkan atau menghambat produksi enzim. Selain konsentrasi substrat, jenis substrat yang digunakan pun menjadi salah satu factor yang menyebabkan perbedaan nilai aktivitas spesifik kitinase, sejalan dengan temuan penelitian sebelumnya oleh (Pamungkas et al., 2023) yang melaporkan bahwa dari tiga jenis substrat yang digunakan yaitu koloidal kitin, kitin serbuk, dan tepung cangkang serbuk, jenis substrat koloidal kitin yang memiliki aktivitas kitinase yang paling tinggi. Perbedaan kemampuan genetik masing-masing isolat bakteri dalam mengekspresikan kitinase turut menyebabkan variasi aktivitas spesifik.

Secara umum, baik isolat RS-A1 maupun RS-A2 menunjukkan potensi sebagai penghasil enzim kitinase. Namun, isolat RS-A2 menunjukkan stabilitas aktivitas enzim yang sedikit lebih baik pada fase pertumbuhan lanjut dibandingkan dengan RS-A1. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kemampuan adaptasi metabolik antar isolat terhadap kondisi lingkungan kultur. Dengan demikian, kedua isolat memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol yang menghasilkan kitinase, namun isolat RS-A2 dapat diprioritaskan untuk produksi enzim dalam skala bioteknologi karena kestabilan aktivitasnya yang lebih baik.

2.5 Kesimpulan

Penelitian ini berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari akar tanaman stroberi. Identifikasi molekuler berdasarkan analisis gen 16S rRNA mengungkapkan bahwa isolat RS-A1 menunjukkan 98,06% kesamaan dengan *Acinetobacter baumannii*, sedangkan isolat RS-A2 menunjukkan 97,21% kesamaan dengan *Bacillus aerius*. Analisis kuantitatif produksi enzim kitinase menunjukkan bahwa isolat RS-A2 menunjukkan aktivitas spesifik kitinase tertinggi, mencapai 0,01146 U/mg. Temuan ini menunjukkan bahwa *Bacillus aerius* endofit yang diisolasi dari akar stroberi memiliki potensi kuat sebagai agen biokontrol terhadap patogen tanaman, biodegrader limbah kitin, dan sumber daya ramah lingkungan untuk pertanian berkelanjutan dan aplikasi bioteknologi.

