



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI
LAHAN KOPI ARABIKA YANG TERSERANG
NEMATODA *Radopholus similis***

SKRIPSI

Oleh
Yenny Rahma
120210103101

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI
LAHAN KOPI ARABIKA YANG TERSERANG
NEMATODA *Radopholus similis***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Program Studi Pendidikan Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan

Oleh
Yenny Rahma
120210103101

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya mempersembahkan skripsi ini dengan segala cinta dan kasih kepada:

1. Orang tua tercinta, Ayahanda Sajidin dan Ibunda Siti Ulfa yang selalu memberikan dukungan baik secara moril maupun materil serta doa yang tiada henti;
2. Dosen pembimbing skripsi yang senantiasa membimbing dan membantu menyelesaikan skripsi ini, Dr. H. Dwi Wahyuni M, Kes. dan Dr. Iis Nur Asyiah S.P., M.P.;
3. Bapak dan ibu guru dari Sekolah Dasar hingga Perguruan Tinggi yang tiada lelah memberikan ilmu yang barokah dan bimbingan dengan sepenuh hati;
4. Almamater Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember yang tercinta dan selalu saya banggakan.

MOTTO

“Jadikan Allah satu-satunya tujuan dan sandaran hidup, saat itulah kebahagiaan tidak perlu dicari, namun ia akan datang bersama keberkahan”

(Silmy Kaffah R.)

“Berkaryalah sehebat yang kau bisa, karena dengan itu kau akan lebih bersinar. Mengapa butuh bersinar? karena dengan bersinar kau akan mudah ditemukan”

(dr. Dyah Sania Artiwi)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Yenny Rahma

NIM : 120210103101

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis*” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Mei 2016

Yang menyatakan,

Yenny Rahma

NIM 120210103101

SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI
LAHAN KOPI ARABIKA YANG TERSERANG
NEMATODA *Radopholus similis***

Oleh

Yenny Rahma

NIM 120210103101

Pembimbing

Dosen pembimbing Utama : Dr. Hj. Dwi Wahyuni M, Kes.

Dosen pembimbing Anggota : Dr. Iis Nur Asyiah S.P., M.P.

PERSETUJUAN

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI
LAHAN KOPI ARABIKA YANG TERSERANG
NEMATODA *Radopholus similis***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Program Studi Pendidikan Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan

Oleh:

Nama Mahasiswa : Yenny Rahma
NIM : 120210103101
Jurusan : Pendidikan MIPA
Program Studi : Pendidikan Biologi
Angkatan Tahun : 2012
Daerah Asal : Negara
Tempat, Tanggal Lahir : Tegalbadeng Timur, 18 Juli 1993

Disetujui Oleh :

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Hj. Dwi Wahyuni, M.Kes.
NIP. 19600309 198702 2 002

Dr. Iis Nur Asyiah, SP., MP.
NIP. 19730614 200801 2 008

PENGESAHAN

Skripsi Berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 19 Mei 2016

Tempat : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember

Tim Penguji:

Pembimbing utama,

Pembimbing anggota,

Dr. Hj. Dwi Wahyuni, M.Kes.

NIP. 19600309 198702 2 002

Dr. Iis Nur Asviah, SP., MP.

NIP. 19730614 200801 2 008

Penguji utama,

Penguji anggota,

Prof. Dr. H. Joko Waluyo, M.Si.

NIP. 19571028 198503 1 001

Mochammad Iqbal, M.Pd.

NIP. 19880120 201212 1 001

Mengesahkan,
Dekan FKIP Universitas Jember

Prof. Dr. Sunardi, M.Pd.

NIP. 19540501 198303 1 005

RINGKASAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis*; Yenny Rahma; 120210103101; 67 halaman; Program Studi Pendidikan Biologi; Jurusan Pendidikan MIPA; Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember.

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tanaman, dapat membentuk koloni tanpa menimbulkan kerusakan pada tanaman tersebut. Bakteri endofit dapat diisolasi dari tanaman kopi. Program konversi lahan kopi di Indonesia menemui kendala yaitu muncul serangan nematoda *Radopholus similis* pada tanaman kopi arabika yang dilakukan di lahan ketinggian menengah (700 – 900m dpl). Nematoda ini menimbulkan gejala kerusakan pada varietas kopi arabika tipe katai tahan penyakit karat daun, tanaman tumbuh meranggas dengan ranting mengering tanpa daun setelah pembuahan pertama. Namun, beberapa tanaman tidak menunjukkan gejala kerusakan, hal ini diduga pada tanaman memiliki bakteri endofit yang membuat pertahanan dalam tubuhnya. Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan induknya, salah satunya yaitu senyawa antimikroba, antifungi, dan nematisidal. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui spesies/genus dan karakter baik morfologi, fisiologi, dan biokimia bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis*.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Submikro Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan MIPA FKIP dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2015 – Februari 2016. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif.

Hasil dari penelitian ini yaitu diperoleh 6 isolat bakteri endofit murni dan 1 isolat bakteri nonendofit. Bakteri endofit ini diduga berasal dari genus *Bacillus* dan *Listeria* yaitu bakteri *Bacillus* sp. SK1, *Bacillus* sp. SK8, *Bacillus* sp. SK10, *Bacillus* sp. SK15, dan *Bacillus circulans* SK13, serta bakteri *Listeria* sp. SK17. Sedangkan bakteri kontrol tidak dapat diidentifikasi.

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pada lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis* ditemukan 6 isolat bakteri endofit. Masing-masing memiliki karakter yaitu (1) bakteri SK1 berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 311,1 – 330 nm, (2) bakteri SK8 berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,100 – 3,889 μm dan diameter 695,7 – 837,7 nm, (3) bakteri SK10 berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,650 – 6,618 μm dan diameter 550 – 777,8 nm, (4) bakteri SK13 berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,190 – 4,488 μm dan diameter 800,8 – 880 nm, (5) bakteri SK15 berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 2,200 – 3,780 μm dan diameter 660 nm – 1,038 μm , (6) bakteri SK17 berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 330 – 311,1 nm.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis*”. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian dengan judul “Pemanfaat Bakteri Endofit dalam Mengendalikan Nematoda *Pratylenchus coffeae* Pada Tanaman Kopi Arabika” yang didanai oleh hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, dan diketuai oleh Dr. Iis Nur Asyiah, SP., MP.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Sunardi, M.Pd., selaku Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember;
2. Dr. Hj. Dwi Wahyuni, M.Kes., selaku Ketua Jurusan Pendidikan MIPA Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Biologi dan selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah membimbing dan meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. Prof. Dr. Suratno, M.Si., selaku Ketua Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember;
4. Dr. Iis Nur Asyiah, SP., MP., selaku Dosen Pembimbing Anggota, Dosen Pembimbing Akademik, dan Ketua Proyek yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melakukan penelitian yang didanai oleh Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2015, serta yang telah membimbing, memberikan semangat, meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
5. Prof. Dr. H. Joko Waluyo, M.Si., dan Mochammad Iqbal, M.Pd., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran-saran dalam penulisan skripsi ini;

6. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember, atas semua bimbingan dan ilmu yang diberikan;
7. Keluarga Besar Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia Ir. Slamet Haryono dan Bapak Rosidi selaku Teknisi Laboratorium Nematologi;
8. Teknisi Laboratorium Program Studi Pendidikan Biologi, Teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA dan Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi;
9. Orang tua tersayang, Ayahanda Sajidin dan Ibunda Siti Ulfa, serta saudaraku Rochmat Arbi Kusuma, Khumaira Ramadhani, dan Hanifa Rosyida Risqi Cahyani terimakasih atas dukungan dan doanya;
10. Keluarga besar Bapak Edi Prasetyo, Dr. Iis Nur Asyiah, SP., MP., Airlangga Putra Prasetyo, Kania Ceta Putri Prasetyo;
11. Sahabatku tercinta Sigit Pratama K.H., Vidyan Sanggara, Rizka Haqi Abadi, Mar'atus Sholihah, dan Nofi Lisviana yang selalu membantu, memotivasi dan memberikan semangat;
12. Seluruh teman-teman angkatan 2012 Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember;
13. Keluarga besar MIKOENDO (Mb' Rifa, Mb' Heni, Mas Dodi, Likha, Winda, Gepsi, Kak Rotul, Rizka, Wulan, Ellen, Danti, Bundo "Fia", Intan, Ervan, Mb' Eva, dan Siska) telah bekerja sama menyelesaikan proyek ini serta Buk Mul yang senantiasa membantu saat proses penelitian;
14. Keluarga Besar IKAHIMBI dan HMPSPB "lumba-lumba" FKIP UNEJ yang selalu memberikan banyak wawasan, pengalaman dan ilmu yang bermanfaat;
15. Keluarga besar kosan Jl. Baturaden 1 No. 9;
16. Keluarga kecil di Rumah Qur'an Muslimah (ustadzah Kibtiyah, Mb' Didin, Mb' Ika, Arin, Dessy, Syafa, dan Ibu serta Embah) yang selalu memberikan semangat.
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga semua doa, bimbingan, wawasan, pengarahan, nasihat, pengalaman, bantuan dan dorongan yang telah dibeikan kepada penulis mendapat balasan yang

lebih baik dari Allah SWT. Akhir kata besar harapan penulis semoga dengan adanya skripsi ini dapat memberikan sumbangsih bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkannya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Mei 2016

Penulis

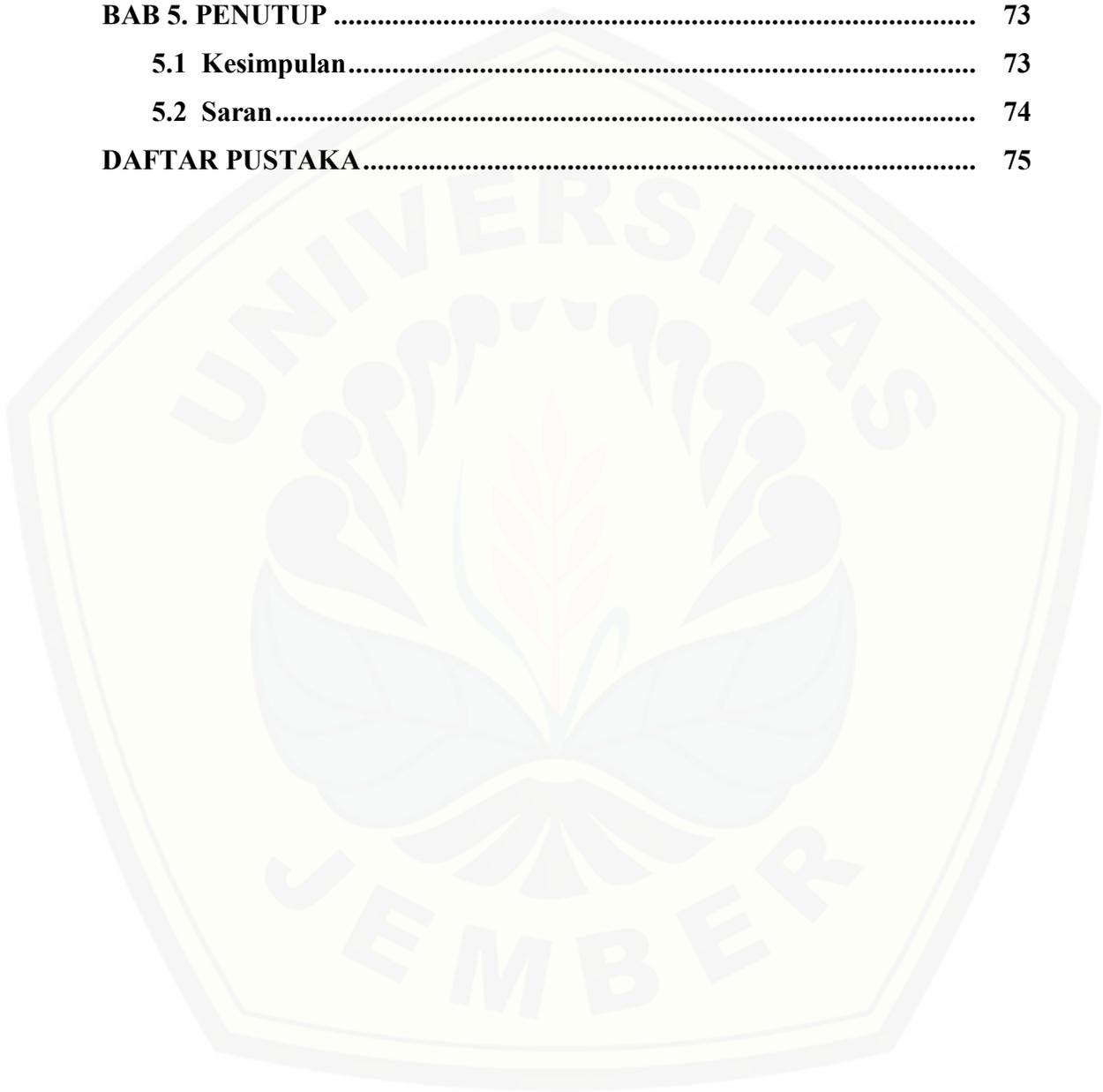
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PERSETUJUAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Bakteri Endofit	5
2.1.1 Definisi Bakteri Endofit	5
2.1.2 Morfologi Bakteri Endofit	6
2.1.3 Metabolit Sekunder Bakteri Endofit	7

2.1.4 Mekanisme Kerja Bakteri Endofit	9
2.1.5 Peranan Bakteri Endofit dalam Mengendalikan Nematoda Parasit Tanaman	10
2.2 Prosedur Isolasi Bakteri Endofit	12
2.2.1 Sterilisasi Permukaan	12
2.2.2 Metode Isolasi Bakteri Endofit	13
2.3 Identifikasi Bakteri Endofit	15
2.3.1 Pengamatan Karakter Morfologi.....	15
2.3.2 Pengamatan Karakter Fisiologi.....	15
2.3.3 Pengamatan Karakter Biokimia	17
2.4 Kopi Arabika	19
2.4.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika	19
2.4.2 Morfologi Tanaman Kopi Arabika	20
2.4.3 Perbedaan Kopi Arabika dengan Kopi Robusta.....	22
2.5 Nematoda Parasit Tanaman Kopi	23
2.6 Nematoda <i>Radopholus similis</i> (Nematoda Pelubang Akar)	23
2.6.1 Klasifikasi <i>Radopholus similis</i>	23
2.6.2 Biologi <i>Radopholus similis</i>	24
2.6.3 Siklus Hidup <i>Radopholus similis</i>	26
2.6.4 Gejala Serangan Nematoda <i>Radopholus similis</i>	27
2.7 Kerangka Teoritis	30
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	31
3.1 Jenis Penelitian	31
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.2.1 Tempat penelitian	31
3.2.2 Waktu penelitian.....	31
3.3 Alat dan Bahan.....	31
3.3.1 Alat Penelitian	31

3.3.2 Bahan Penelitian.....	32
3.4 Penentuan Populasi, Sampel.....	32
3.4.1 Populasi Penelitian	32
3.4.2 Sampel Penelitian	32
3.5 Definisi Operasional.....	32
3.6 Desain Penelitian	33
3.7 Prosedur Penelitian	33
3.7.1 Persiapan Alat dan Bahan	33
3.7.2 Sterilisasi Alat dan Bahan	34
3.7.3 Isolasi Bakteri Endofit	34
3.7.4 Peremajaan Isolat Bakteri	34
3.7.5 Identifikasi Bakteri	35
3.7.6 Identifikasi <i>Manual for the Identification of Medical Bacteria</i> (Cowan dan Steel, 1970)	43
3.8 Diagram Alur Penelitian	44
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
4.1 Hasil Penelitian.....	45
4.1.1 Hasil Isolasi	45
4.1.2 Hasil Identifikasi	46
4.1.2.1 Hasil Pengamatan Morfologi Bakteri.....	46
4.1.2.2 Hasil Pengamatan Fisiologi dan Biokimia	50
4.1.2.3 Hasil Spesies yang Ditemukan	51
4.2 Pembahasan.....	53
4.2.1 Isolasi Bakteri	53
4.2.2 Identifikasi Bakteri.....	54
4.2.2.1 Pengamatan Karakter Morfologi	54
4.2.2.2 Pengamatan Karakter Fisiologi.....	56
4.2.2.3 Pengamatan Karakter Biokimia	60

4.2.2.4 Karakteristik Masing-Masing Genus dan Spesies Isolat	
Bakteri.....	64
BAB 5. PENUTUP	73
5.1 Kesimpulan.....	73
5.2 Saran.....	74
DAFTAR PUSTAKA.....	75



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Perbedaan Kopi Arabika dan Robusta	22
4.1 Pengamatan Morfologi Makroskopis Bakteri	46
4.2 Pengamatan Morfologi Mikroskopis Bakteri	48
4.3 Hasil Pengamatan Fisiologi dan Biokimia	50
4.4 Hasil Spesies yang Ditemukan	51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman kopi arabika, A. Batang tanaman kopi arabika, B. Buah tanaman kopi arabika, C. Daun tanaman kopi arabika	22
2.2 <i>Radopholus similis</i> , A. betina dan B. jantan	25
2.3 <i>Radopholus similis</i> jantan, A. kepala dan B. spikula.....	25
2.4 <i>Radopholus similis</i> betina dengan panjang antara 550 - 880 μm dan diameter 24 μm , A. kepala dan B. vulva.....	26
2.5 Siklus hidup <i>Radopholus similis</i>	27
2.6 Contoh tanaman kopi arabika sehat (a) dan tanaman kopi arabika yang menunjukkan gejala kerusakan (b) di Ijen-Raung, Kabupaten Bondowoso.....	28
2.7 Akar tanaman sehat (a) dan akar tanaman yang menunjukkan gejala kerusakan (b) asal tanaman kopi arabika	29
2.8 Kerangka Teoritis	30
3.1 Diagram Alur Penelitian	44

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Matriks Penelitian.....	84
B. Isolasi Bakteri.....	86
C. Isolat Bakteri Murni.....	92
D. Pengamatan Makroskopis	93
E. Uji Fisiologi.....	96
F. Uji Biokimia	103
G. Alat-alat dan Bahan Penelitian	119
H. Proses Identifikasi Bakteri	122
I. Panduan Pengamatan Karakter Morfologi Makroskopis	123
J. Lembar Konsultasi Penyusunan Skripsi	131

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tanaman (Melliawati, 2015 (Online); Juwita, 2010: 5; dan Hidayah dan Yulianti, 2008: 88), dapat membentuk koloni tanpa menimbulkan kerusakan pada tanaman tersebut, kebanyakan dari bakteri endofit adalah menguntungkan karena dapat menghasilkan antibiotik yang mampu melindungi tanaman dari serangan patogen, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen biokontrol (Firmansyah, 2012: 3), pemacu pertumbuhan karena meningkatkan ketersediaan nutrisi tertentu, dan menghasilkan hormon pertumbuhan (Bacon dan Hinton, 2007). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari perakaran nilam dapat menekan populasi *P. brachyurus* 73,9% pada tanaman nilam di rumah kaca (Harni *et al.*, 2007: 7) dan filtratnya dapat membunuh *P. brachyurus* sebesar 91-100% *in vitro* (Harni *et al.*, 2010: 43), serta dari hasil penelitian Makete *et al.* (2009: 121) menunjukkan ada 14 bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari tanaman kopi Ethiopia yang dapat menghambat pertumbuhan nematoda *M. incognita*, bakteri tersebut diantaranya: *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Chryseobacterium balustinum*, *Cedacea davisae*, *Cytophaga johnsonae*, *Lactobacillus paracasei*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus halobius*, *Pseudomonas syringae* dan *Stenotrophomonas maltophilia*.

Program konversi lahan kopi di Indonesia menemui beberapa kendala yaitu muncul serangan nematoda *Radopholus similis* pada konversi lahan kopi robusta ke kopi arabika yang dilakukan di lahan ketinggian menengah (700 – 900m dpl). Nematoda ini menimbulkan gejala kerusakan pada varietas kopi arabika tipe katai tahan penyakit karat daun, tanaman tumbuh meranggas dengan ranting mengering

tanpa daun setelah pembuahan pertama (Hulupi dan Mulyadi, 2007: 177). Namun beberapa tanaman tidak menunjukkan gejala kerusakan.

Pada tanaman kopi yang tidak menunjukkan gejala kerusakan dengan ciri-ciri: pohon tumbuh subur, daun lebat berwarna hijau tidak menguning, dan akar memiliki banyak serabut yang berwarna cerah pada lahan kopi yang terserang nematoda *Radopholus similis*, diduga memiliki bakteri endofit yang membuat pertahanan dalam tubuh tanaman tersebut. Dari beberapa hasil penelitian, menyatakan bakteri ini mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya (Tan *et al.*, 2001 dalam Radji, 2005: 118). Metabolit sekunder yang dihasilkan salah satunya yaitu senyawa anti-mikroba seperti *siderophores* yang mampu menginduksi ketahanan tanaman, menguraikan dinding sel patogen, menghambat pertumbuhan patogen (Juwita, 2010: 5) dan sebagai antifungi, serta nematisidal (Hidayah dan Yulianti, 2008: 88).

Kemampuan bakteri endofit dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Radji, 2005: 118). Sehingga perlu adanya penelitian mengenai spesies/genus bakteri endofit yang berasal dari lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis*, maka akan dilakukan penelitian dengan judul Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

- a. Apa sajakah spesies/genus bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis*?
- b. Bagaimanakah karakter morfologi, biokimia, dan fisiologi dari masing-masing spesies/genus bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis*?

1.3 Batasan Masalah

Untuk mempermudah pembahasan dan mengurangi kerancuan dalam menafsirkan masalah dalam penelitian ini, maka perlu adanya batasan masalah sebagai berikut:

- a. Subjek penelitian adalah bakteri endofit dari akar tanaman kopi yang terlihat sehat diantara tanaman kopi arabika yang menunjukkan gejala kerusakan di lahan tanaman kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis* di kawasan Ijen-Raung Kabupaten Bondowoso.
- b. Sterilisasi permukaan digunakan untuk mengurangi mikroba yang menempel pada permukaan akar.
- c. Isolasi menggunakan media *Tryptic Soy Agar* (TSA).
- d. Identifikasi meliputi karakter morfologi koloni, fisiologi (uji motilitas, pewarnaan gram, pewarnaan tahan asam, pewarnaan spora, dan uji KOH), dan biokimia (uji katalase, uji fermentasi glukosa, dan uji Oksidasi-Fermentasi).

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui spesies/genus bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis*.
- b. Mengetahui karakter morfologi, fisiologi (uji motilitas, pewarnaan gram, pewarnaan tahan asam, pewarnaan spora, dan uji KOH), dan biokimia (uji katalase, uji fermentasi glukosa, uji oksidatif-fermentatif, uji fermentasi gelatin, uji pati, uji fermentasi manitol, uji indol, uji V-P, uji nitrat, dan uji urea) dari spesies/genus bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis*.

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

- a. Bagi ilmu pengetahuan, dapat menambah wawasan keilmuan dan pengetahuan tentang keanekaragaman bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari akar kopi arabika di lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis*.
- b. Bagi penulis, dapat mengaplikasikan ilmu pengetahuan yang telah didapat selama kuliah dan menjadi pengalaman berharga, serta dapat memperluas ilmu pengetahuan.
- c. Bagi peneliti lain, dapat digunakan sebagai bahan penelitian selanjutnya mengenai sumber agen pengendali hayati atau sebagai bahan perbandingan dan acuan untuk penelitian sejenis.
- d. Bagi masyarakat, dapat memberikan motivasi untuk memanfaatkan bakteri endofit sebagai agen pengendali hayati pada tanaman kopi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Endofit

2.1.1 Definisi Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tanaman tersebut dan dapat diisolasi dari jaringan tanaman yang sudah disterilisasi permukaannya atau diekstrak dari jaringan tanaman bagian dalam (Hallmann *et al.*, 1997: 895). Bakteri ini dapat hidup pada bagian tanaman seperti pada akar, batang, bunga, dan kotiledon (Resti *et al.*, 2013: 168). Populasi bakteri paling tinggi terdapat pada akar (Hidayah dan Yulianti, 2008: 88).

Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman melalui lubang alami maupun luka, baik yang diakibatkan oleh faktor biotik maupun abiotik atau sebagai akibat dari proses pertumbuhan akar tanaman. Bakteri ini secara aktif mengkolonisasi baik secara lokal maupun sistemik melalui proses hidrolisis (Hidayah dan Yulianti, 2008). Bakteri endofit dalam mengkolonisasi inangnya dapat bersifat obligat ataupun fakultatif. Simbiosis antara tanaman dengan bakteri endofit bersifat netral, mutualisme, atau komensalisme (Bacon dan Hinton, 2006: 155). Simbiosis mutualismenya yaitu bakteri endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dalam melawan patogen, sedangkan tanaman mendapat derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperoleh selama hidup bakteri endofit (Tanaka *et al.*, dalam Simarmata *et al.*, 2007: 86).

Bakteri endofit tumbuh dalam jaringan tanaman, dimana tanaman yang satu tentunya berbeda dengan tanaman lainnya, maka tempat hidup bakteri sangat unik sifatnya. Fisiologi tumbuhan tinggi termasuk yang berasal dari spesies yang sama akan beda di lingkungan yang berbeda. Oleh karena itu, keanekaragaman bakteri endofit sangatlah tinggi (Prasetyoputri dan Atmosukarto, 2006).

2.1.2 Morfologi Bakteri Endofit

Bakteri endofit umumnya ditemukan berasal dari genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan *Staphylococcus* (Nursulistyarini, 2014). Morfologi dari masing-masing genus sebagai berikut:

a. Genus *Pseudomonas*

Genus ini adalah bakteri batang gram negatif berukuran 0,6-2 μm , bersifat aerob, bergerak dengan flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub), katalase positif, oksidase positif, bersifat patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. Bakteri ini tidak berspora, dan tidak mempunyai selubung. Suhu optimum untuk pertumbuhan *pseudomonas* adalah 42°C (Jawetz *et al.*, 1996: 249-250, 252). Genus *Pseudomonas* tidak menghasilkan gas pada uji glukosa, indol negatif, *methyl red* negatif, *Voges-Proskauer* negatif. Bentuk koloni bulat, tepi tidak rata, transparan, tidak memperlihatkan warna hijau (Madigan *et al.*, 1997: 699).

b. Genus *Bacillus*

Genus *Bacillus* termasuk batang besar berukuran 1 x 3-4 μm , gram positif, yang membentuk rantai, motil, menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas, bersifat aerob, katalase positif, dan oksidasi bervariasi. Tiap spesies berbeda dalam penggunaan gula, sebagian melakukan fermentasi dan sebagian tidak (Jawetz *et al.*, 1996: 194, Barrow dan Feltham, 1993). Kebanyakan anggota genus *Bacillus* dapat membentuk endospora yang dibentuk secara intraseluler sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, oleh karena itu 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. Bakteri ini adalah organisme saprofitik, biasanya ditemukan dalam air, udara, debu, tanah dan sedimen. Terdapat beberapa jenis bakteri yang bersifat saprofit pada tanah, air, udara dan tumbuhan, seperti *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*. Koloni bakteri ini berbentuk bulat dan

menyerupai kaca yang diukir bila disinari cahaya, dapat mengencerkan gelatin, dan pertumbuhan pada perbenihan agar-agar tegak mirip pohon cemara yang terbalik (Jawetz *et al.*, 1996: 194).

c. Genus *Staphylococcus*

Staphylococcus adalah sel gram positif berbentuk bulat dengan ukuran 1 μm , biasanya tersusun dalam rangkaian tak beraturan seperti anggur, tidak membentuk spora. Bakteri ini mudah tumbuh pada berbagai perbenihan dan mempunyai metabolisme aktif, merangkai karbohidrat, serta menghasilkan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua (Jawetz *et al.*, 1996: 211), bundar, halus, menonjol dan berkilau (Todar, 2002). Bakteri ini akan tumbuh secara optimal pada suhu 22°C – 37°C , bersifat aerob atau mikroaerofilik. Dapat memproduksi toksin pada semua strain terlihat pada penanaman dalam media sederhana yang berisi asam-asam amino, garam glukosa dan faktor pertumbuhan yaitu thiamin dan asam nicotinat. Dalam media kaldu yang berisi dekstrosa, sukrosa, maltosa, dan manitol akan terjadi pemecahan karbohidrat menjadi asam tanpa gas, menghasilkan katalase. Bakteri ini tahan terhadap suhu 50°C selama 30 menit. Koloni pada perbenihan padat berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau (Jawetz *et al.*, 1996: 211-212).

Bakteri endofit yang berasal dari genus *Pseudomonas* dan genus *Bacillus* dapat mengendalikan berbagai jenis cendawan patogen, karena bakteri endofit ini menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik, antifungi, dan nematisidal (Hidayah dan Yulianti, 2008).

2.1.3 Metabolit Sekunder Bakteri Endofit

Kemampuan bakteri endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari tanaman inangnya tersebut, dalam jumlah yang lebih tinggi dan tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Radji, 2005:

118). Berbagai jenis endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman inangnya, dan berhasil dibiakkan dalam media pembenihan yang sesuai. Bakteri endofit menginfeksi tanaman sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim, antibiotika serta metabolit lain (Putra, 2007). Beberapa diantaranya yaitu:

a. Bakteri endofit menghasilkan antibiotik

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit merupakan suatu antibiotik yang mampu melindungi tanaman dari serangan patogen, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen biokontrol (Firmasnyah, 2012). Bakteri ini juga mampu menginduksi ketahanan, meningkatkan pertumbuhan tanaman, menguraikan dinding sel patogen, dan menghambat pertumbuhan patogen dengan menghasilkan senyawa antimikroba seperti *siderophores* (Juwita, 2010: 5). *Siderophore* merupakan zat yang memiliki berat molekul rendah, yang dapat terikat erat dengan besi (Fe). *Siderophore* dihasilkan oleh mikroorganisme sehingga dapat menjamin bahwa mikroorganisme itu dapat memperoleh cukup Fe dari lingkungan tumbuhannya. Beberapa strain RPTT seperti *Pseudomonas fluorescens siderophores* (pseudobactin) yang dapat menghambat perkembangan jamur patogen *Erwinia caratovara* penyebab busuk pada kentang (Husen, 2006 dalam Juwita 2010: 31). Bakteri endofit juga menghasilkan beberapa senyawa antibiotik seperti phenazines, pyrrolnitrin, pycocyanin, dan phloroglucianol dan asam pseudomonat (Bacon dan Hinton, 2006).

b. Bakteri endofit penghasil enzim ekstra seluler

Enzim ekstraseluler yang dihasilkan bakteri endofit diantaranya adalah kitinase, protease, dan selulase. Enzim kitinase merupakan enzim penting yang dihasilkan oleh bakteri antagonis untuk mengendalikan patogen telur tanah, karena enzim ini dapat mendegradasikan dinding sel patogen yang terdiri dari kitin seperti dinding sel cendawan, nematoda dan serangga. Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin disebut kitinase total atau kitinase non-spesifik. Enzim yang mendegradasi kitin secara acak dari dalam disebut *endokitinase*, sedangkan yang membebaskan N-asetilglukosamina dari kitin disebut N-asetil- β -Dglukosaminidase

(NAGase) dan yang membebaskan unit dimer dari β -1,4-Nasetilglukosamina (kitobiosa) disebut *eksokitinase* (Tronsmo *et al.*, 1993 dalam Nugroho, 2003).

Enzim protease berperan dalam mendegradasi dinding sel patogen, protease dapat digunakan oleh bakteri tersebut untuk melakukan penetrasi secara aktif ke dalam jaringan tanaman (Indarti, 2008). Benhamou *et al.* (1996) melaporkan enzim selulase dan pektinase yang dihasilkan *Pseudomonas fluorescens* dapat digunakan oleh bakteri tersebut untuk mengkolonisasi daerah interselluler jaringan korteks akar, sehingga terjadi penghambatan invasi patogen.

c. Bakteri endofit menginduksi ketahanan tanaman

Supramana dan Harni (2008) menyatakan bahwa *Pseudomonas putida* dapat menekan perkembangan penyakit tanaman dengan persaingan ruang dan nutrisi (unsur karbon), merangsang pertumbuhan tanaman dan menginduksi ketahanan tanaman. Bakteri endofit juga dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif lainnya yang dapat berperan sebagai penghasil hormon pertumbuhan, dan memacu pertumbuhan melalui proses peningkatan ketersediaan nutrisi tertentu bagi tanaman (Bacon dan Hinton, 2007). Keanekaragaman spesies bakteri endofit merefleksikan banyaknya mekanisme kerja yang mungkin terjadi untuk melawan patogen, yang memungkinkan patogen memproduksi senyawa antibiotik untuk melawan bakteri endofit tersebut (Bacon dan Hinton, 2006).

2.1.4 Mekanisme Kerja Bakteri Endofit

Mekanisme kerja dari bakteri endofit sebagai agensi pengendali hayati diantaranya: memproduksi bahan campuran antimikroba, kompetisi ruang dan nutrisi, kompetisi mikronutrisi seperti zat besi dan produksi siderofor, serta dapat menyebabkan tanaman inang menjadi resisten (Bacon dan Hinton, 2006). Sedikit yang mengetahui tentang mekanisme lain yang digunakan oleh antagonis bakteri endofit terhadap patogen seperti antibiotik, kompetisi, dan lisis (Schulz, 2006: 54-55).

Antibiotik menggambarkan kemampuan dari bakteri endofit untuk menghambat pertumbuhan patogen dengan memproduksi antibiotik atau toksin. Walaupun sebagian besar dari bakteri endofit menunjukkan perlawanan terhadap patogen secara *in vitro* (Schulz, 2006: 55), sangat sedikit yang mengetahui tentang pengaruh dari antibiotik sebagai kontrol patogen pada jaringan akar. Kompetisi merupakan salah satu faktor yang penting sebagai kontrol patogen oleh bakteri endofit sejak adanya koloni organisme-organisme yang sama-sama memanfaatkan nutrisi yang sama. Data yang menunjukkan kompetisi sebagai salah satu mekanisme kontrol bakteri endofit adalah tetap dalam keadaan kekuarangan nutrisi (Schulz, 2006: 57). Melisis dinding sel adalah mekanisme potensial yang dilakukan oleh bakteri endofit agar dapat mengontrol patogen. Bakteri endofit diisolasi dari akar kentang yang menghasilkan enzim hidrolisis seperti selulase, kitinase dan glukonase (Schulz, 2006: 59). Enzim ini dapat mendegradasikan dinding sel patogen yang terdiri dari kitin seperti dinding sel cendawan, serangga dan nematoda parasit (Tronsmo *et al.*, 1993 dalam Nugroho, 2003).

2.1.5 Peranan Bakteri Endofit dalam Mengendalikan Nematoda Parasit Tanaman

Nematoda parasit tanaman dapat menyebabkan kerusakan tanaman, sehingga mengakibatkan penurunan produksi, yang akhirnya merugikan petani. Nematoda yang menyebabkan kerusakan pada tanaman hampir semuanya hidup didalam tanah, baik yang hidup bebas didalam tanah bagian luar akar dan batang didalam tanah bahkan ada beberapa parasit yang hidupnya bersifat menetap didalam akar dan batang (Mustika dan Nuryani, 2003: 2).

Berbagai usaha untuk mengendalikan nematoda parasit sudah banyak dilakukan di antaranya adalah menggunakan klon kopi tahan nematoda sebagai batang bawah, penggunaan pestisida, menggunakan jamur, pupuk kandang, limbah kulit kopi, dan juga bakteri (Wiryadiputra *et al.*, 2010: 157-158). Salah satu upaya dilakukan dengan meningkatkan peran mikroba tanah yang bermanfaat melalui upaya

peningkatan kandungan beberapa unsur hara di dalam tanah, peningkatan efisiensi penyerapan unsur hara, pengendalian patogen tular tanah melalui interaksi kompetisi, memproduksi zat pengatur tumbuh yang dapat meningkatkan perkembangan sistem perakaran tanaman, peningkatan aktivitas mikroba tanah heterotrof yang bermanfaat (Munif dan Hipi, 2011: 2).

Mikroorganisme di alam dapat dibagi menjadi mikroorganisme simbiotik dan mikroorganisme nonsimbiotik, yang hidup bebas dan mandiri dalam tanah dan memfiksasi nitrogen seperti *Clostridium pasturianum* dan *Azotobacter* (Pelczar *et al.*, 1998). Mikroorganisme simbiotik berinteraksi dengan tanaman seperti bakteri rhizosfer dan endofit (Munif dan Hipi, 2011: 2). Menurut Harni *et al.* (2007) bakteri endofit dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman nilam (berat tajuk tanaman, berat akar, dan panjang akar). Bakteri endofit dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman baik secara langsung maupun tidak langsung.

Mekanisme peningkatan pertumbuhan tanaman oleh bakteri endofit dapat terjadi dengan beberapa proses di antaranya melarutkan senyawa fosfat, fiksasi nitrogen, merangsang pertumbuhan akar lateral, dan menghasilkan hormon pertumbuhan seperti etilen, auksin, dan sitokinin (Thakuria *et al.*, 2004). Secara tidak langsung, bakteri terlebih dahulu menekan pertumbuhan mikroorganisme pengganggu, yaitu *deleterious microorganisms* (DMO) melalui mekanisme kompetisi, predasi, dan antibiotik yang dihasilkannya. Mekanisme pengendalian yang lain adalah kompetisi dengan patogen (Sikora *et al.*, 2007), kompetisi yang terjadi adalah kompetisi tempat dan makanan. Kompetisi ini terjadi karena nematoda dan endofit menempati ruang ekologis yang sama di akar. Hal ini akan berkaitan erat dengan kepadatan bakteri, tingkat kolonisasi dan lokasi bakteri dalam kaitannya dengan tempat makan nematoda. Selain itu, mekanisme infeksi bakteri diduga secara umum yang lebih berperan adalah enzim-enzim. Enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri melalui struktur infeksi pada permukaan tubuh nematoda mampu melakukan penetrasi kutikula (Mustika dan Nuryani, 2006). Penetrasi dimulai dengan

pertumbuhan spora pada kutikula (Setiawati *et al.*, 2004). Spora bakteri menempel ada tubuh nematoda kemudian berkecambah dan menembus kutikula nematoda (Mustika dan Nuryani, 2006). Kemudian enzim kitinase akan menghidrolisis kulit telur nematoda yang sebagian besar penyusunnya adalah kitin (Indarti, 2008). selanjutnya perkembangbiakan nematoda menjadi terhambat dan akhirnya akan mati (Mustika dan Nuryani, 2006).

Mekanisme bakteri endofit dalam mengendalikan nematoda parasit, antara lain dengan menginduksi ketahanan tanaman (Hallmann, 2001). Induksi ketahanan tanaman adalah fenomena terjadinya peningkatan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen akibat rangsangan. Ketahanan ini merupakan perlindungan tanaman yang didasari pada mekanisme ketahanan yang dirangsang oleh perubahan metabolik. Induksi ketahanan tanaman terhadap nematoda dapat melalui peningkatan asam salisilat, peroksidase, fitoaleksin, patogenesis related protein (PR) dan senyawa fenolik (Tian *et al.*, 2007). Untuk dapat mengaplikasikan bakteri endofit untuk mengendalikan nematoda, maka perlu dilakukan isolasi terlebih dahulu.

2.2 Prosedur Isolasi Bakteri Endofit

Prosedur isolasi bakteri endofit adalah kunci penting untuk penelitian bakteri endofit (Hallmann *et al.*, 1997: 897), karena hal ini cukup sensitif untuk mendapatkan bakteri endofit, beberapa prosedur isolasi hanya cocok untuk jaringan tanaman tertentu. Proses isolasi sering menggunakan gabungan sterilisasi permukaan jaringan akar dengan perendaman jaringan tanaman serta menggunakan metode streak atau metode plate (Schulz *et al.*, 2006: 300).

2.2.1 Sterilisasi Permukaan

Secara teoritis menurut Schulz (2006: 300-302), sterilisasi harus membunuh mikroba apapun pada permukaan tanaman tanpa mempengaruhi jaringan inang dan bakteri endofit. Kondisi ini digunakan untuk membunuh mikroba pada permukaan

saja, tetapi kemungkinan juga beberapa bakteri endofit juga ikut mati. Secara umum, sterilisasi permukaan akar terdiri dari beberapa langkah yaitu:

- a. Mencuci seluruh jaringan akar di bawah air mengalir untuk menghilangkan partikel tanah dan sebagian besar mikroba epifit pada permukaan akar dan lainnya,
- b. Sterilisasi permukaan untuk menghilangkan sisa koloni mikroba dari permukaan akar, bahan yang umum digunakan untuk sterilisasi permukaan adalah natrium hipoklorit, etanol, dan hidrogen peroksida. Natrium hipoklorit adalah oksidan yang sangat baik. Perendaman natrium hipoklorit 2% dilakukan selama 2 menit dan perendaman pada etanol dilakukan selama 1 menit,
- c. Melakukan beberapa bilasan dalam air steril secara aseptik dan,
- d. Menyediakan kontrol goresan permukaan akar sterilisasi untuk kontrol atau pembandingan bakteri yang akan tumbuh pada medium ekstrak (Munif dan Hipi, 2010: 2).

2.2.2 Metode Isolasi Bakteri Endofit

Metode disini sangat penting dan menjadi pembatas dalam penelitian bakteri endofit, karena ukurannya yang sangat kecil dan banyak metode yang melelahkan, perkembangan pengetahuan bakteri endofit yang lambat. Namun, banyak peneliti terlibat dengan penelitian bakteri endofit ini (Hallmann *et al.*, 1997: 897). Isolasi bakteri endofit ada beberapa metode yang sering digunakan yaitu dengan metode sebar dan metode tuang (Pranoto *et al.*, 2014: 3), metode pengenceran berseri pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dengan kekuatan 1/10 (Saylendra dan Firnia, 2013: 21), metode yang pernah digunakan Munif (2011: 2), serta metode yang pernah digunakan oleh Tomita (2003).

Metode isolasi bakteri endofit yang digunakan Munif (2011: 2) dengan memotong akar tanaman dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringanginkan. Sebanyak 1 g akar diambil dan disterilisasi permukaan berturut-turut dengan alkohol

70% (30 detik), kemudian dicelupkan dalam larutan NaOCl 2% (2 menit), dan selanjutnya dicelup ke dalam air steril. Sebelum penggerusan, akar kopi dioleskan pada petridish berisi media TSA (sebagai kontrol). Jika bakteri tumbuh pada kontrol, maka perlu diidentifikasi bakteri yang akan tumbuh sebagai bakteri endofit menggunakan penanda bakteri pada kontrol. Akar dipindahkan ke dalam mortal dan digerus dan ditambahkan 9 ml aquades steril. Sebanyak 1 ml ekstrak akar dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril, kemudian dikocok hingga homogen, selanjut diambil 1 ml ekstrak dan diencerkan secara seri hingga pengenceran 10⁻⁴. Selanjutnya sebanyak 0,1 ml ekstrak dari seri pengenceran 10⁻³ dan 10⁻⁴ dimasukkan ke dalam petridish steril yang telah diisi media TSA 5% (masing-masing 2 ulangan) dan kemudian disebar merata dalam petridish. Ekstrak yang telah disebar dalam petridish, diinkubasi selama 3 hari, kemudian dihitung jumlah koloni bakteri.

Metode isolasi bakteri endofit yang digunakan Tomita (2003) yaitu, tanaman diambil dari lapangan dan kemudian sampel tanaman dibersihkan dari kotoran dengan cara mencucinya dengan air mengalir. Kemudian bagian tanaman dipotong dengan ukuran 2x2 cm yaitu bagian daun dan bongkol tanaman sedangkan bagian ranting dengan ukuran panjang 2 cm dan selanjutnya disterilisasi permukaan menggunakan larutan etanol 75% selama 1 menit, Natrium Hipoklorit 5,3% selama 5 menit dan terakhir dibilas dengan etanol kembali selama 30 detik. Setelah itu, sampel dibilas dengan air steril beberapa kali dan kemudian *overlay* pada medium NA dengan cara membelah bagian tanaman dan meletakkan pada posisi tertelungkup. Cawan petri yang telah mengandung sampel tanaman diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari. Bakteri yang tumbuh secara bertahap dimurnikan satu per satu dengan cara memindahkan bakteri endofit yang telah tumbuh pada medium NA dengan bentuk dan warna koloni yang berbeda yang kemudian dipindahkan ke medium NA yang baru sebanyak 1 ose dengan metode *streak plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada

suhu ruang dan dilakukan sampai diperoleh koloni tunggal, kemudian dilakukan identifikasi.

2.3 Identifikasi Bakteri Endofit

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan melakukan pengamatan karakter morfologi koloni, fisiologi dan biokimia, dalam identifikasi menggunakan buku panduan Cowan dan Steel, yaitu standar manual internasional untuk identifikasi bakteri.

2.3.1 Pengamatan Karakter Morfologi

Pengamatan morfologi koloni meliputi pengamatan terhadap bentuk dan warna koloni. Isolat bakteri di tumbuhkan pada medium dan dilakukan pengamatan meliputi: pertumbuhan koloni bakteri pada medium agar miring yaitu bentuk pertumbuhan pada bekas goresan, pertumbuhan koloni bakteri pada medium agar tegak yaitu bentuk pertumbuhan pada bekas tusukan dan pertumbuhan koloni bakteri pada medium agar lempeng yaitu bentuk, tepian, dan elevasi. Uji KOH dilakukan dengan larutan KOH 3% ditetaskan pada kaca preparat dan mencampurkan isolat bakteri pada larutan tersebut. Reaksi gram negatif ditunjukkan dengan adanya lendir pada kaca preparat inokulasi yang ikut terangkat (Hadioetomo, 1990 dalam Dewi, 2013: 143). Selain itu dilakukan pengamatan morfologi tunggal dengan melihat bentuk sel dan ukuran sel.

2.3.2 Pengamatan Karakter Fisiologi

Pengamatan karakter fisiologi dilihat dari pewarnaan gram, pewarnaan tahan asam, pewarnaan spora, uji motilitas, uji kebutuhan oksigen dan uji temperatur.

a. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram merupakan salah satu pewarnaan diferensial karena untuk membedakan antara gram positif dan gram negatif (Jutono, 1980: 37). Pada bakteri

gram positif iodium bersenyawa dengan zat kimia dalam sel dan mempermudah dalam mempertahankan warna *kristal violet* secara kuat pada protoplasma bakteri (Gupte, 1990: 35), sehingga bakteri gram positif tampak berwarna *violet*. Sedangkan bakteri gram negatif tidak dapat mengikat *kristal violet* secara kuat, dapat dilunturkan dengan peluntur dan dapat diwarnai oleh safranin, sehingga bakteri gram negatif tampak bewarna merah (Jutono, 1980: 38).

b. Pewarnaan Tahan Asam

Sebagian bakteri dapat menahan karbol fuksin walaupun dapat dilunturkan dengan asam, sifat tahan asam ini disebabkan oleh adanya asam mikolat, sehingga disebut bakteri tahan asam (Gupte, 1990: 36).

c. Pewarnaan Spora

Spora bersifat tahan kemikalia, sehingga spora sukar diwarnai dan tidak dapat diwarnai dengan pewarnaan biasa (Jutono, 1980: 40). Pada pengamatan gram spora akan tampak sebagai daerah kosong dalam tubuh bakteri (Gupte, 1990: 36). Pewarnaan spora dapat dilakukan dengan *methylene blue* pewarnaan Ziel Neelsen (*acid fast*), sehingga spora tampak berwarna biru atau hijau (Jutono, 1980: 40-41).

d. Uji Motilitas

Uji motilitas digunakan untuk melihat pergerakan dari bakteri dengan pengamatan menggunakan *hanging drop* (Jutono, 1980: 42).

e. Uji Kebutuhan Oksigen

Uji kebutuhan oksigen dilakukan untuk mengetahui sifat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan medium NB. Sifat pertumbuhan bakteri adalah aerob, anaerob, fakultatif atau mikroaerofil. Bakteri anaerob akan tumbuh mengelompok pada dasar medium, bakteri anaerob fakultatif akan tumbuh tersebar di seluruh medium, bakteri mikroaerofil akan tumbuh mengelompok sedikit di bawah permukaan medium, sedangkan bakteri aerob akan tumbuh pada permukaan medium.

f. Uji Temperatur

Masing-masing bakteri memerlukan temperature tertentu untuk hidupnya. Temperature bakteri dapat dibedakan menjadi 3 yaitu temperature minimum, optimum dan maksimum. Berdasarkan perbedaan temperature pertumbuhannya dibedakan menjadi bakteri psikhrofil, mesofil dan termofil. Pada pengujian ini, bakteri akan ditumbuhkan pada temperature yang berbeda-beda yaitu 37⁰C dan 65⁰C (Jutono, 1980: 121).

2.3.3 Pengamatan Karakter Biokimia

a. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat tertentu dan menghasilkan alkohol, asam serta gas (Jutono, 1980: 90). Dalam uji ini digunakan media pertumbuhan cair yang mengandung karbohidrat tertentu (glukosa dan manitol). Terbentuknya asam akan ditunjukkan dengan perubahan warna medium, sedangkan terbentuknya gas ditunjukkan dengan adanya gelembung pada tabung durham (Jutono, 1980: 90).

b. Uji Katalase

Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1990 dalam Dewi, 2013: 142).

c. Uji Oksidatif-Fermentatif (O-F)

Uji oksidatif-fermentatif digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri untuk memetabolisme karbohidrat secara oksidatif atau fermentatif (Lay, 1994). Oksidase akan terjadi pada bakteri aerob yaitu pada tabung yang tidak ditutup dengan paraffin. Hasil positif jika terbentuk warna kuning pada tabung yang tidak ditutup karena hanya akan memproduksi reasi asam pada tabung yang tidak ditutup. Sedangkan fermentasi terjadi pada bakteri anaerob yaitu tabung yang ditutup dengan

paraffin maupun tidak ditutup. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning, karena bakteri tersebut menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup maupun tidak. Proses fermentasi glikosa akan diubah menjadi glukosa G-Phospat yang kemudian dirombak menjadi asam piruvat dan oksidase akan merubah glukosa menjadi asam piruvat (Cowan dan Steel, 1970: 23).

d. Uji Hidrolisis Gelatin

Hidrolisis gelatin oleh bakteri dikatalisis oleh ekoenzim yang disebut gelatinase. Gelatin adalah protein yang diperoleh dari tulang, tulang rawan atau tulang ikat hewani lainnya. Gelatin yang dicerna tidak mampu membentuk gel dan bersifat cair (Lay, 1994 dalam Pastra, 2012: 81).

e. Uji Hidrolisis Pati

Uji hidrolisis pati untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghidrolisis pati dengan cara menghasilkan enzim amilase. Pati merupakan polisakarida yang memiliki berat molekul yang tinggi, karena ukurannya yang besar, polisakarida tidak mampu diserap oleh membran sel (Capuccino dan Sherman, 1992).

f. Uji Indol

Indol dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri yang tumbuh pada medium yang mengandung asam amino triptofan dengan menunjukkan bau busuk dan cara menentukan adanya indol adalah dengan menggunakan pengujian kovacs (Jutono, 1980: 91).

g. Uji *Voges Proskouer* (V-P)

Uji *Voges Proskouer* (V-P) ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah tua yang menunjukkan adanya kandungan asetoin yang diproduksi oleh bakteri dalam larutan larutan KOH 40% dalam akuades steril dan *á-naphthol* 5% dalam ethanol, yang bertindak sebagai katalis (Hadioetomo, 1990 dalam Dewi, 2013: 143).

h. Uji reduksi nitrat

Keberadaan nitrit dalam media diuji dengan penambahan asam sulfanilat dan α -naftilamin yang akan bereaksi dengan nitrit yang ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah atau merah muda. Pada tabung yang tidak menunjukkan perubahan warna, ditambahkan bubuk Zn untuk melihat reduksi nitrat menjadi nitrit. Bila didapatkan nitrat dalam medium, maka kaldu berubah warna menjadi merah muda atau merah karena Zn mereduksi nitrat menjadi nitrit dan nitrit ini bereaksi dengan reagen uji dan terbentuk warna merah (Lay, 2004). Reduksi nitrat terjadi pada kebanyakan bakteri anaerob fakultatif dengan menggunakan nitrit. O_2 dapat menghambat reduksi nitrat sehingga dalam reaksi, O_2 dihabiskan kemudian menggunakan nitrat pada bakteri anaerob (Suriawiria, 1985).

i. Uji Hidrolisis Urea

Uji hidrolisis urea bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis urea dengan menggunakan enzim urease dan mengubah pH media dari pH netral menjadi basa (Lay, 1994 dalam Pastra, 2012: 81).

2.4 Kopi Arabika

Kopi arabika (*Coffea arabica* L.) berasal dari Afrika, yaitu dari daerah pegunungan Etiopia. Namun, kopi arabika baru dikenal oleh masyarakat dunia setelah tanaman tersebut dikembangkan di luar daerah asalnya, yaitu di Yaman di bagian selatan Jazirah Arab. Melalui para saudagar Arab minuman kopi menyebar ke daratan lainnya (Rahardjo, 2012: 8). Ahli tumbuh-tumbuhan (botanis), Linnaeus, mengira kopi arabika berasal dari negeri Arab sehingga menamakan tanaman kopi arabika dengan nama ilmiah *Coffea arabica* L..

2.4.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika

Kedudukan tanaman kopi arabika dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae	
Subkingdom	: Viridiplantae	
Infrakingdom	: Streptophyta	
Superdivisi	: Embryophyta	
Divisi	: Tracheophyta	
Subdivisi	: Spermatophytina	
Class	: Magnoliopsida	
Superordo	: Asteranae	
Ordo	: Gentianales	
Family	: Rubiaceae	
Genus	: <i>Coffea</i> L.	
Species	: <i>Coffea arabica</i> L.	(itis.gov, 2015)

2.4.2 Morfologi Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

Kopi arabika termasuk dalam familia Rubiaceae (kopi-kopian) dan genus *Coffea*. Kopi arabika merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Tanaman kopi arabika tumbuh rimbun dan membentuk pohon perdu kecil, membutuhkan waktu 3 tahun dari saat perkecambahan sampai menjadi tanaman berbungan dan menghasilkan buah kopi (Rahardjo, 2012: 9).

Buah tanaman kopi tersusun berkelompok atau bergerombol, memiliki ukuran yang cukup besar. Buah yang masih muda berwarna hijau sedangkan yang sudah matang akan berwarna merah cerah. Bentuk buah bulat telur dengan diameter kurang lebih 10-15 mm (Soediby, 1998). Adapun buah kopi tersusun dari kulit buah (epicarp), daging buah (mesocarp) dikenal dengan sebutan pulpa, dan kulit tandung (endocarp). Buah yang terbentuk akan matang selama 7-12 bulan (Rahardjo, 2012: 9). Buah kopi umumnya mengandung dua butir biji dalam satu buahnya, akan tetapi terkadang hanya mengandung satu butir dan bahkan ada yang tidak berbiji (Najiyati

dan Danarti, 2007). Biji kopi dibungkus oleh kulit keras disebut kulit tanduk (parchement skin). Biji mempunyai alur pada bagian datarnya (Rahardjo, 2012: 9).

Biji kopi arabika memiliki beberapa karakteristik yang khas dibandingkan biji jenis kopi lainnya, seperti bentuknya yang agak memanjang, bidang cembungnya tidak terlalu tinggi, lebih bercahaya dibandingkan dengan jenis lainnya, ujung biji mengkilap, dan celah tengah dibagian datarnya berlekuk (Panggabean, 2011: 21). Semua spesies kopi berbunga berwarna putih dan beraroma wangi. Bunga tersebut muncul pada ketiak daunnya (Rahardjo, 2012: 9).

Daun tanaman kopi berwarna hijau mengkilap yang tumbuh berpasangan dengan berlawanan arah. Bentuk daun tanaman kopi lonjong dengan tulang daun tegas. Kopi arabika berdaun tipis serta memiliki percabangan yang lentur. Tanaman kopi memiliki dua tipe pertumbuhan cabang, yaitu cabang ortotrop tumbuh ke arah vertikal dan cabang plagiotrop ke arah horizontal (Raharjo, 2012: 8). Kopi arabika memiliki tajuk yang kecil, ramping, ada yang bersifat katai dan ukuran daun yang kecil (Panggabean, 2011: 14).

Perakaran tanaman kopi arabika lebih dalam daripada kopi robusta. Tanaman kopi arabika dapat berakar lebih dalam pada tanah normal, tetapi 90% dari perakaran tanaman kopi berada pada lapisan tanah di atas 30 cm. Kopi arabika lebih tahan kering dibandingkan dengan kopi robusta karena perakaran tanaman kopi arabika lebih dalam daripada kopi robusta (Rahardjo, 2012: 8).



Gambar 2.1 Tanaman kopi arabika, A. Batang tanaman kopi arabika, B. Buah tanaman kopi arabika, C. Daun tanaman kopi arabika (Mukidi, 2012).

2.4.3 Perbedaan Kopi Arabika dengan Kopi Robusta

Perbedaan kopi arabika dengan kopi robusta dapat dilihat pada tabel.

Tabel 2.1 Perbedaan Kopi Arabika dan Robusta, Sumber: Laban *et al.*, 2012: iv

Pembeda	Kopi Arabika	Kopi Robusta
Tempat tumbuh	1000 – 2000 m dpl	400-700 m dpl
Curah hujan	1200 – 2000 mm / tahun	2000-3000 mm / tahun
Suhu	15-24°C	24-30°C
Akar	Dalam	Dangkal
Bunga	Setelah hujan	Tidak tetap
Siap panen	8 – 11 bulan setelah berbunga	10 - 11 bulan setelah berbunga
Bentuk biji	Datar	Oval
Kadar kafein	Rendah 0,8 - 1,4%	Tinggi 1,7 - 4,0%

2.5 Nematoda Parasit Tanaman Kopi

Nematoda merupakan salah satu mikroorganisme yang berbentuk seperti cacing, memiliki bentuk tubuh bilateral simetris, dan bersifat parasit pada tumbuhan, memiliki ukuran yang sangat kecil yaitu antara 300 – 1000 mikron, memiliki panjang hingga 4 mm dan lebar 15 – 35 mikron (Mustika dan Nuryani, 2003). Dua jenis nematoda yang utama menyerang tanaman kopi adalah *Pratylenchus coffeae* (*P. coffeae*) dan *Radopholus similis* (*R. similis*).

2.6 Nematoda *Radopholus similis* (Nematoda Pelubang Akar)

Radopholus similis atau nematoda pelubang akar (*burrowing nematode*) merupakan nematoda endoparasit migratori pada berbagai jenis tanaman (Mustika dan Nuryani, 2003). *Radopholus similis* terutama hidup di dalam akar, tetapi dapat migrasi melalui tanah ke tanaman lain. Semua stadia dapat dijumpai di dalam akar dan tanah. Jantan bersifat non parasit, sedangkan stadia lainnya bersifat parasit terhadap tanaman. Nematoda betina dewasa dapat hidup lama di dalam tanah yang lembab, tetapi dalam kondisi ini larva akan segera mati (Dropkin, 1992).

2.6.1 Klasifikasi *Radopholus similis*

Kedudukan *Radopholus similis* dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Subkingdom	: Bilateria
Infrakingdom	: Protostomia
Superphylum	: Ecdysozoa
Phylum	: Nematoda
Class	: Chromadorea
Ordo	: Tylenchida
Family	: Hoplolaimidae

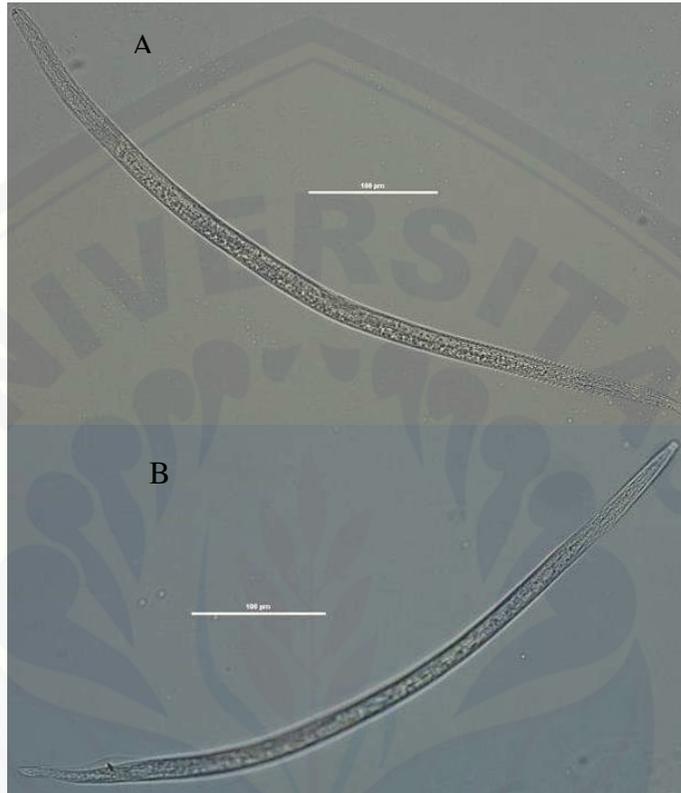
Genus : *Radopholus*
Species : *Radopholus similis* (itis.gov, 2015)

2.6.2 Biologi *Radopholus similis*

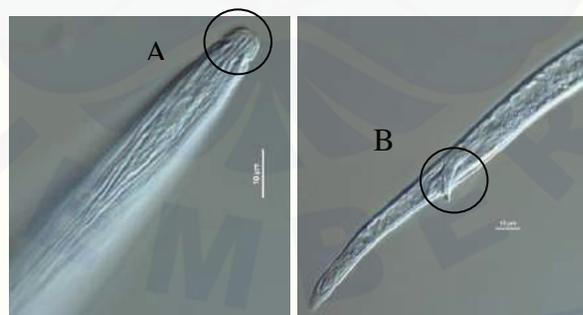
Dari sisi biologi, nematoda luka akar mempunyai perbedaan dengan nematoda yang lain. Nematoda luka akar dapat berkembang biak lebih baik di dalam akar tanaman yang pertumbuhannya tidak baik. Tanaman yang mempunyai zat makanan minimal mendorong nematoda berkembang dibandingkan dengan tanaman yang menyediakan zat makanan optimal (Dropkin, 1992). Kehidupan nematoda juga dipengaruhi oleh keberadaan filum air baik di dalam tanah atau dalam tanaman. Filum air berperan bagi mobilitas nematoda, menentukan inaktif dan tidaknya nematoda, bahkan berpengaruh terhadap mortalitasnya (Williams dan Bridge, 1983). Porositas, kelembaban, dan aerasi tanah juga berperan dalam keberlangsungan hidup nematoda (Sastrahidayat, 1992). Pada umumnya nematoda berada di lapisan tanah antara 15-30 cm, namun dapat berkembang biak jika tanah mempunyai banyak pori dan mempunyai cukup udara.

Nematoda betina mudah dikenali karena mempunyai bibir yang mendatar dan posisi vulva agak kebelakang dari pertengahan badan. Nematoda betina memiliki panjang tubuh = 614 μm , panjang stilet = 19 μm , panjang ekor = 64 μm . diameter tubuh = 24 μm , letak vulva = 59 % . Nematoda jantan mempunyai kepala yang membulat dan stilet yang kurang berkembang. Nematoda jantan memiliki panjang tubuh = 614 μm , panjang stilit = 13 μm , panjang ekor = 70 μm , panjang spikula = 18 μm , diameter tubuh = 17 μm . Secara keseluruhan nematoda dewasa *Radopholus similis* panjang sekitar 0,6-0,7 mm. Nematoda jantan muncul agak lambat dan khusus di tempat-tempat yang paling sedikit nematodanya telah berkembang satu generasi. Telur diletakkan satu-satu didalam akar, telur menetas setelah beberapa hari, dan larva yang keluar berkembang menjadi nematoda dewasa dalam 4-5 minggu. Jika jaringan akar telah rusak, nematoda betina meninggalkan akar yang terinfestasi dan

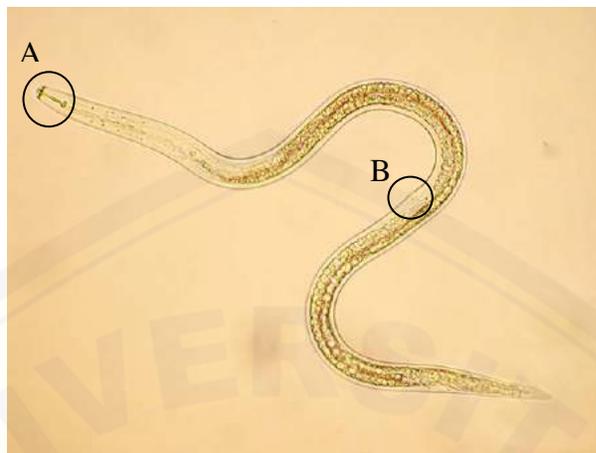
bermigrasi melalui tanah ke akar atau tanaman lain yang masih sehat (Semangun, 2001).



Gambar 2.2 *Radopholus similis*, A. betina dan B. jantan (Zhao dan Crosby, 2011).



Gambar 2.3 *Radopholus similis* jantan, A. kepala dan B. spikula (Zhao dan Crosby, 2011).



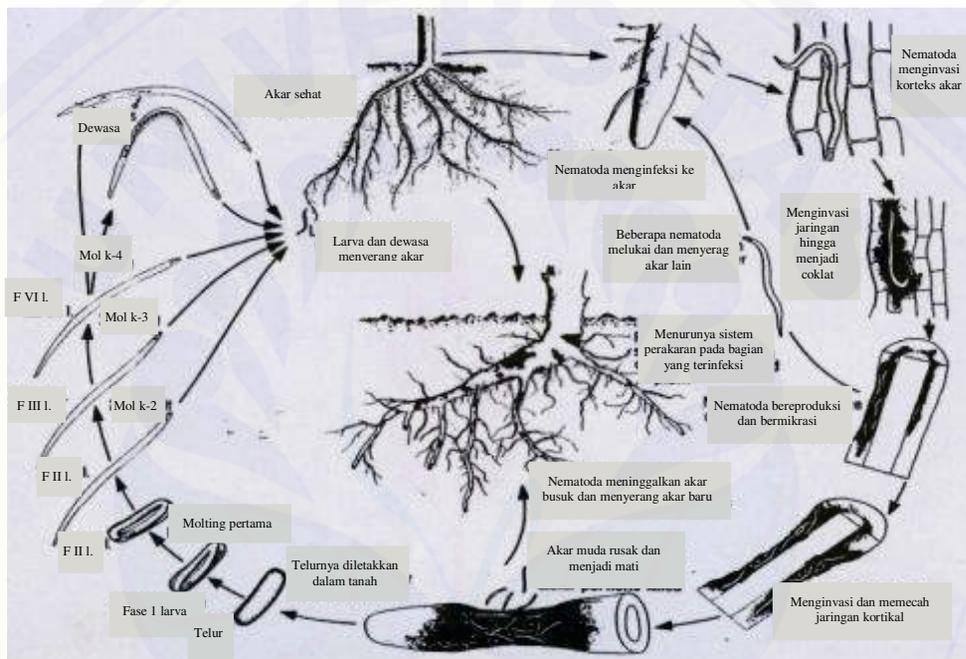
Gambar 2.4 *Radopholus similis* betina dengan panjang antara 550 - 880 μm dan diameter 24 μm , A. kepala dan B. vulva (Brooks, 2014).

2.6.3 Siklus Hidup *Radopholus similis*

Siklus hidup *Radopholus similis* seluruhnya berlangsung di dalam akar. *Radopholus similis* masuk ke dalam akar tanaman pada 24 jam setelah inokulasi atau setelah nematoda menyentuh akar. Sel-sel sekitar tempat penetrasi berubah warna menjadi coklat tua, dan 72 jam setelah penetrasi terbentuk luka-luka pada akar. Bagian yang disukai oleh *Radopholus similis* untuk penetrasi adalah daerah ujung akar, tetapi ada juga yang melakukan penetrasi pada 1,0 - 1,50 cm di atas daerah ujung akar tersebut. Kemudian dengan proses lisis nematoda membentuk terowongan-terowongan sampai ke bagian korteks akar. Nematoda betina meletakkan telur-telurnya di antara korteks akar pada 5 hari setelah penetrasi. Nematoda tersebut tidak menyerang bagian empulur akar, tetapi pembuluh jaringan (xylem) tersumbat oleh zat (substansi) seperti getah. Pada waktu penetrasi ke dalam akar, *Radopholus similis* mengeluarkan beberapa macam enzim antara lain adalah enzim hidrolase (selulase), invertase (sakharase, sukrase atau fructofuranoksidase) dan enzim pektolitik (Dubert dan Rohde, 1971).

Larva nematoda masuk ke dalam bagian akar yang masih lunak dengan cara mengeluarkan enzim selulase, yaitu merombak selulosa. Selulosa merupakan bahan

penyusun dinding sel. Akibat larutnya selulosa maka akan terjadi rongga pada sel-sel penyusun akar (Williams dan Bridge, 1983). Setelah sel akar rusak, nematoda berpindah ke bagian korteks akar, menetap, dan berkembang biak. Infestasi primer dilakukan oleh nematoda betina yang memasuki ujung rambut akar, kemudian membuat terowongan longitudinal melalui parenkim. Sel-sel yang sakit segera mati dan tampaklah bercak-bercak luka yang gelap (Dropkin, 1992).



Gambar 2.5 Siklus hidup *Radopholus similis* (Agrios, 1982 dalam Mustika, tanpa tahun: 81).

2.6.4 Gejala Serangan Nematoda *Radopholus similis*

Secara umum, serangan nematoda menyebabkan kerusakan pada akar karena nematoda mengisap sel-sel akar sehingga pembuluh jaringan akar terganggu, akibatnya translokasi air dan hara terhambat. Serangan nematoda juga dapat mempengaruhi proses fotosintesa dan transpirasi (Evans, 1982; Melakeberhan, et.al., 1987 dalam Mustika dan Nuryani, 2006), sehingga pertumbuhan tanaman menjadi terhambat, warna daun menguning seperti gejala kekurangan hara dan mudah layu. Seringkali gejala tanaman yang terserang nematoda akar kopi bersamaan dengan

serangan OPT lain seperti jamur akar putih, jamur akar coklat, penyakit antraknos, bahkan dapat mengundang hama lain seperti semut dan rayap.



(a)

(b)

Gambar 2.6 Contoh tanaman kopi arabika sehat (a) dan tanaman kopi arabika yang menunjukkan gejala kerusakan (b) di Ijen-Raung, Kabupaten Bondowoso (Hasil Observasi, 2015).

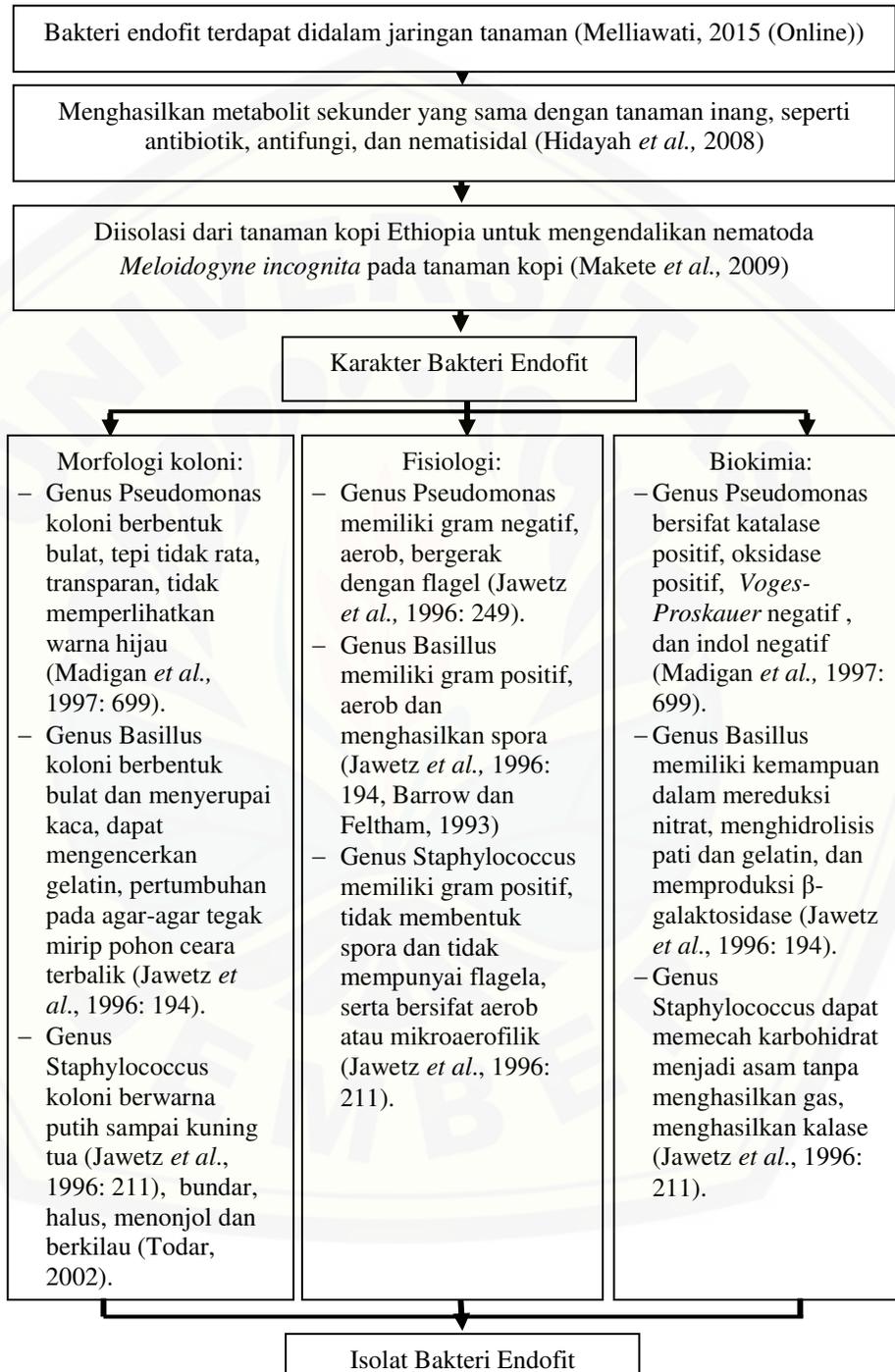


(a)

(b)

Gambar 2.7 Akar tanaman sehat (a) dan akar tanaman yang menunjukkan gejala kerusakan (b) asal tanaman kopi arabika (Hasil Observasi, 2015).

2.7 Kerangka Teoritis



Gambar 2.8 Kerangka Teoritis

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian exploratif. Penelitian ini mengidentifikasi bakteri endofit yang terdapat dalam akar kopi arabika di lahan yang terserang nematoda *Rodophols similis*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Tahap persiapan pengambilan akar tanaman kopi di lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Rodophols similis*, Kawasan Ijen-Raung, Kabupaten Bondowoso, sedangkan tahap persiapan mengisolasi bakteri dilaksanakan di Laboratorium Submikrobiologi Jurusan P.MIPA Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember dan identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 7 bulan pada bulan Agustus 2015 – Februari 2016.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang akan digunakan antara lain adalah : *autoklave*, mikroskop, cawan petri, *sentrifuse*, mortal, laminar, *effendrof*, ose, tabung reaksi, gelas ukur, kompor listrik, *L glass*, kaca benda dan kaca penutup, pipet, *bunsen*, dan mikropipet.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Tryptic Soy Agar* (TSA), media *Tryptic Soy Broth* (TSB), NaOCl 2%, alkohol 70%, bahan pewarnaan gram, bahan pewarnaan spora, bahan pewarnaan tahan asam, media uji oksidatif dan fermentatif (O-F), media untuk uji katalase, media uji urea, media uji VP, media uji reduksi nitrat, media uji pati, media uji glukosa, media uji glukosa, media uji manitol, media uji gelatin, air destilasi, akar kopi yang sehat dari lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis*.

3.4 Penentuan Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh lahan kopi arabika Kawasan Ijen-Raung, Kabupaten Bondowoso yang terserang Nematoda *Radopholus similis*.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sample dalam penelitian ini adalah akar sehat tanaman kopi arabika pada lahan kopi arabika yang terserang Nematoda *Radopholus similis* di Dusun Pondok Jeruk, Desa Sukorejo, Kecamatan Sumber Wringin, Kabupaten Bondowoso.

3.5 Definisi Operasional

Peneliti memberikan pengertian untuk menjelaskan operasional penelitian agar tidak menimbulkan pengertian ganda terhadap pembaca. Adapun definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Isolasi bakteri endofit merupakan cara untuk memisahkan atau memindahkan bakteri endofit dari akar tanaman kopi arabika yang terlihat sehat di lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis* menggunakan medium *Tryptic Soy Agar* (TSA), sehingga diperoleh kultur murni.

- b. Tanaman kopi yang tidak menunjukkan gejala kerusakan memiliki ciri-ciri: pohon tumbuh subur, daun lebat berwarna hijau tidak menguning, dan akar memiliki banyak serabut yang berwarna cerah.
- c. Identifikasi bakteri endofit adalah usaha atau metode yang dilakukan untuk mengetahui secara rinci aktivitas-aktivitas yang terjadi pada bakteri endofit, sehingga bakteri dapat diperiksa dalam keadaan hidup atau mati. Identifikasi bermaksud untuk mengetahui genus atau jenis bakteri endofit apa saja yang bisa bertahan hidup pada tanaman kopi arabika yang sehat dalam suatu lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis* dengan melihat karakter (Menentukan genus: pewarnaan gram, pewarnaan tahan asam, pewarnaan spora, uji motilitas, uji katalase, uji glukose, dan uji oksidatif-fermentatif, untuk menentukan spesies dilihat dari hasil pengamatan genus yang diperoleh kemudian dilakukan uji sesuai genus yang diperoleh). Misal: Genus Bacillus, maka dilakukan uji temperatur 65°C, glukosa anaerob, gelatin, pati, manitol, indol, *voges proskouer* (V-P), nitrat, dan urea.

3.6 Desain Penelitian

Penelitian ini berupa penelitian eksploratif dengan subjek penelitian berupa bakteri endofit pada akar kopi dari beberapa tanaman yang terlihat sehat di antara tanaman yang menunjukkan gejala kerusakan di lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis*.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Alat dan Bahan

Persiapan Alat dan Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian dilakukan di tempat penelitian, antara lain yaitu dilakukan tahap persiapan pengambilan akar tanaman kopi yang sehat dari lahan kopi arabika, Kawasan Ijen-Raung, Kabupaten Bondowoso. Sedangkan tahap persiapan mengisolasi bakteri di Laboratorium Sub-

mikrobiologi Jurusan Pendidikan MIPA Program Studi Pendidikan Biologi FKIP dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan MIPA.

3.7.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan medium TSA (medium yang umum digunakan untuk menumbuhkan bakteri endofit (Schulz *et al.*, 2006: 310)) yang akan digunakan disterilkan dengan *autoklave* pada temperatur 121°C pada tekanan uap 15 lb/in selama 15 menit (Marlina, 2008).

3.7.3 Isolasi Bakteri Endofit

Akar kopi di sterilkan sebanyak 1 gram secara bertahap dengan alkohol 70% selama 30 detik, NaOCl 2% selama 2 menit, dan dengan aquades steril bertahap sampai 3 kali. Mengoleskan akar pada medium TSA sebagai kontrol, kemudian akar dipindahkan ke dalam mortal yang sudah di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit, kemudian digerus dan ditambahkan 9 ml aquades steril. Sebanyak 1 ml ekstrak akar dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril, kemudian dikocok hingga homogen, selanjut diambil 1 ml ekstrak dan diencerkan secara seri hingga pengenceran 10^{-4} . Selanjutnya sebanyak 0,1 ml ekstrak dari seri pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} dimasukkan ke dalam *petridish* steril yang telah diisi media TSA 5% (masing-masing 2 ulangan) dan kemudian disebar merata dalam petridish. Ekstrak yang telah disebar dalam petridish, diinkubasi selama 3 hari (72 jam), kemudian dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Koloni yang tumbuh pada saat isolasi dimurnikan, dipindah ke media gliserin dalam effendorf 1,5 ml dan disimpan dalam lemari es.

3.7.4 Peremajaan Isolat Bakteri

Isolat bakteri diremajakan dengan metode streak plate pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

3.7.5 Identifikasi Bakteri

Pengujian terhadap sifat-sifat morfologi, fisiologi dan biokimia dilakukan pada bakteri endofit dan bakteri kontrol untuk mengetahui jenis bakteri hingga tingkat genus ataupun spesies.

a. Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi Morfologi Makroskopis meliputi:

- 1) Pada medium lempeng yang diamati adalah
 - a) Pertumbuhan yaitu pertumbuhan koloni dipermukaan atau dibawah medium.
 - b) Bentuk koloni : *punctiform, circular, filaments, irregular, curled, amoeboid, myceloid, rhizoid.*
 - c) Permukaan : licin, kasar, membentuk lingkaran *konsentrik*, seperti sisir *radier (radiate)*.
 - d) Elevasi : *flat, raised, convex, umbonate.*
 - e) Bentuk tepi : *entire, undulate, lobate, erose, filamentous, curled.*
 - f) Bentuk struktur dalam : *amorf*, butir halus atau kasar, *filament, curled, konsentrik.*
- 2) Pada medium miring

Langkah kerja yang dilakukan untuk pengamatan pada medium miring TSA adalah dengan menanam strike pada medium TSA yang dimiringkan pada tabung reaksi. Yang diamati adalah sebagai berikut :

 - a) Bentuk pertumbuhan : *filiform, echinulate, beaded, spreading, arborsecent, rhizoid, plumose*
 - b) Bau : tidak berbau, bau
- 3) Pada medium tegak

Langkah kerja pengamatan yang dilakukan pada medium TSA tegak adalah dengan mengambil sedikit isolat bakteri murni menggunakan jarum-N steril kemudian ditusukkan sampai setengah dari ketinggian medium pada tabung

reaksi. Yang diamati pada medium TSA tegak adalah bentuk pertumbuhan pada bekas tusukan : *filiform, echinulate, beaded, villous, rhizoid, arboriscent*.

4) Pada medium cair

Langkah kerja pengamatan yang dilakukan pada medium TSB (*Tryptic Soy Broth*) adalah dengan mengambil sedikit isolat murni menggunakan ose steril kemudian dicelupkan sedikit ke dalam medium. Yang perlu diamati adalah :

- a) Pertumbuhan pada permukaan : *ring, pellicle, flocculent, membranous*, tak membentuk selaput
- b) Kekeruhan : sedikit, sedang, hebat
- c) Bau : tak berbau, berbau seperti
- d) Endapan : kompak, bentuk dan ukurannya tidak tertentu, granuler, butir-butir, berlapis-lapis, kental, banyak sekali, sedikit, tidak ada endapan.

b. Karakteristik fisiologi

1) Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara:

- a) Membersihkan kaca objek dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen
- b) Mengambil isolat bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek
- c) Menetesi isolat bakteri dengan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit
- d) Mencuci dengan air mengalir
- e) Mengering anginkan
- f) Menetesi isolat bakteri dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit
- g) Mencuci dengan air mengalir
- h) Mengering anginkan
- i) Menetesi isolat bakteri dengan alkohol 95% selama 30 detik
- j) Mencuci dengan air mengalir

- k) Menganginkan hingga kering
- l) Menetesi isolat bakteri dengan safranin selama 30 detik
- m) Mencuci dengan air mengalir
- n) Mengering anginkan
- o) Melakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mengikat warna kristal violet, sedangkan bakteri gram negatif ditandai dengan warna merah muda (Hadioetomo, 1993). Selain itu, dapat dilakukan pengamatan kemurnian bakteri endofit tersebut dan bentuk sel bakteri dengan cara bakteri yang tumbuh kemudian diamati bentuk selnya secara mikroskopik pada kaca preparat sehingga dapat diketahui bentuknya (kokus, batang atau spiral),.

2) Pewarnaan Tahan Asam

Pewarnaan tahan asam dilakukan dengan cara:

- a) Mengambil masing-masing isolat bakteri secara aseptik dengan menggunakan jarum ose
- b) Mengoleskan bakteri secara menyebar merata pada gelas objek yang terlebih dahulu disterilkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades
- c) Memfiksasi isolat bakteri di atas nyala bunsen sampai kering
- d) Menetesi larutan pewarna karbol fuksin berlebihan selama lebih kurang 5-10 menit diatas nyala api
- e) Mencuci dengan air mengalir dan dikering anginkan
- f) Menetesi larutan alkohol asam sampai agak kemerahan
- g) Membilas dengan air dan dikering anginkan
- h) Menetesi larutan *methylen blue* selama 30 detik
- i) Membilas dengan air dan dikering anginkan
- j) Mengamati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat. Sebagai indikasi tahan asam maka akan menunjukkan warna merah.

3) Pewarnaan Spora

Pewarnaan Spora dilakukan dengan cara:

- a) Menginokulasi bakteri ke dalam medium miring.
- b) Menginkubasi bakteri selama 3-7 hari (agar bakteri dapat menghasilkan spora)
- c) Mengambil masing-masing isolat bakteri secara aseptik dengan menggunakan jarum ose
- d) Mengoleskan bakteri secara menyebar merata pada gelas objek yang terlebih dahulu disterilkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades
- e) Memfiksasi isolat bakteri di atas nyala bunsen sampai kering
- f) Menutup preparat dengan kertas yang mudah menyerap air
- g) Meletakkan diatas air mendidih
- h) Menetesi larutan pewarna *malachite green* berlebihan selama lebih kurang 10 menit
- i) Mencuci dengan air mengalir selama 30 detik dan dikering anginkan
- j) Menetesi larutan safranin selama 1 menit
- k) Membilas dengan air dan dikering anginkan
- l) Mengamati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat. Sebagai indikasi terdapatnya endospora akan berwarna hijau, dan bagian sel yang tidak mengandung endospora akan berwarna merah terang.

4) Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan cara :

- a) Meletakkan 1 tetes isolat bakteri pada gelas penutup.
- b) Meletakkan gelas penutup tersebut secara terbalik pada *hanging droup*.
- c) Mengamati pergerakan bakteri pada mikroskop.

5) Uji Kebutuhan Oksigen

Uji kebutuhan oksigen dilakukan dengan cara:

- a) Menggunakan medium TSB

- b) Menginokulasi isolat pada medium TSB
 - c) Menginkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37⁰ C.
 - d) Mengamati sifat pertumbuhan bakteri pada medium TSB. Bakteri anaerob akan tumbuh mengelompok pada dasar medium, bakteri anaerob fakultatif akan tumbuh tersebar di seluruh medium, bakteri mikroaerofil akan tumbuh mengelompok sedikit di bawah permukaan medium, sedangkan bakteri aerob akan tumbuh pada permukaan medium.
- 6) Uji Temperatur
- Uji temperatur dilakukan dengan cara:
- e) Menggunakan medium TSA
 - f) Menginokulasi isolat pada medium TSA miring
 - g) Menginkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37⁰C dan suhu 65⁰C.
 - h) Mengamati sifat pertumbuhan bakteri pada masing-masing medium, apabila terdapat bakteri pada suhu 37⁰C maka bakteri dapat tumbuh pada suhu tersebut dan sama halnya dengan pertumbuhan pada suhu 65⁰C.
- c. Karakterisasi Biokimia
- 1) Uji Fermentasi Karbohidrat
- Uji fermentasi karbohidrat yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji glukosa dan maltosa. Dilakukan dengan cara :
- a) Menandai kaldu karbohidrat dengan etiket
 - b) Menginokulasikan biakan bakteri ke dalam kaldu glukosa dan manitol
 - c) Menginkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Uji fermentasi karbohidrat bersifat positif apabila terlihat perubahan warna menjadi kekuningan dan negatif apabila warnanya tetap merah.
- 2) Uji Katalase
- Uji katalase dilakukan dengan cara:
- a) Meletakkan 2 tetes H₂O₂ pada kaca objek yang bersih
 - b) Mengambil isolat bakteri menggunakan jarum ose

c) Memindahkan ke atas kaca objek dan dicampurkan. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen.

3) Uji Oksidasitif-Fermentatif (O-F)

Uji Oksidasitif-Fermentatif (O-F) dengan cara:

- a) Membuat medium TSB dengan campuran BTB dan Agar, sebanyak 2 tabung
- b) Menginokulasi bakteri pada 2 tabung tersebut, satu tabung ditutup dengan paraffin dan tabung yang lain tidak.
- c) Menginkubasi selama 14 hari.
- d) Melakukan pengamatan, Oksidase akan terjadi pada bakteri aerob yaitu pada tabung yang tidak ditutup dengan paraffin. Hasil positif jika terbentuk warna kuning pada tabung yang tidak ditutup karena hanya akan memproduksi reaksi asam pada tabung yang tidak ditutup. Sedangkan fermentasi terjadi pada bakteri anaerob yaitu tabung yang ditutup dengan paraffin maupun tidak ditutup. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning, karena bakteri tersebut menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup maupun tidak.

4) Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin dilakukan dengan cara:

- a) Menginokulasi isolat bakteri ke dalam medium nutrisi gelatin pada tabung reaksi secara aseptik
- b) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam
- c) Meletakkan kultur pada pendingin dengan suhu 4°C selama 30 menit. Indikator pengamatan reaksi positif jika medium tetap menjadi cair, dan negatif apabila medium berubah menjadi padat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis gelatin sehingga medium tetap cair saat didiamkan pada suhu 4°C selama 30 menit.

5) Uji Hidrolisis Pati

Uji hidrolisis pati dilakukan dengan cara:

- a) Memasukkan *starch agar* dalam cawan petri
- b) Menginokulasi isolat bakteri dengan cara menempatkan satu mata ose biakan ditengah cawan petri kemudian disebarakan seluas 0,5 cm
- c) Menginkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C
- d) Menambahkan beberapa tetes larutan iodium di atas permukaan koloni isolat bakteri yang tumbuh, uji akan bernilai positif apabila di sekeliling koloni terbentuk zona bening dan ini akan menandakan terjadinya proses hidrolisis pati dan uji akan bernilai negatif di sekeliling koloni terbentuk warna biru kehitaman.

6) Uji Indol

- a) Menggunakan media pepton 1%.
- b) Menginokulasi isolat bakteri ke dalam media tersebut.
- c) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
- d) Menambahkan tetes reagen *Kovac's* setelah diinkubasi.
- e) Interpretasi hasil : negatif (-) : Tidak terbentuk lapisan cincin berwarna merah pada permukaan biakan, artinya bakteri ini tidak membentuk indol dari triptophan sebagai sumber karbon. Positif (+) : Terbentuk lapisan cincin berwarna merah pada permukaan biakan, artinya bakteri ini membentuk indol dari triptophan sebagai sumber karbon.

7) Uji *Voges Proskouer* (VP)

Uji *Voges Proskouer* (VP) dilakukan dengan cara:

- a) Menanam biakan pada medium MR-VP
- b) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan warna media yang menjadi keruh

- c) Menambahkan ke dalam tabung *Barrit's* reagen, terdiri atas larutan KOH 40% dalam akuades steril dan *á-naphthol* 5% dalam ethanol, yang bertindak sebagai katalis
- d) Mengocok perlahan tiap 3-5 menit
- e) Mengamati adanya perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah tua yang menunjukkan adanya kandungan asetoin yang diproduksi oleh bakteri dalam larutan.

8) Uji Reduksi Nitrat

Uji reduksi nitrat dilakukan dengan cara:

- a) Menginokulasikan isolat bakteri pada medium masing-masing dua tabung
- b) Menggunakan medium tanpa inokulum sebagai control
- c) Menginkubasi selama dua hari dalam suhu 37°C
- d) Memasukkan 1 ml larutan asam sulfanilat dan larutan α -naphthylamine dalam masing-masing tabung.
- e) Menggojok, apabila setelah digojok terbentuk warna merah maka menunjukkan terbentuknya nitrit. Pada tabung yang tidak menunjukkan perubahan warna, ditambahkan bubuk Zn untuk melihat reduksi nitrat menjadi nitrit. Bila didapatkan nitrat dalam medium, maka kaldu berubah warna menjadi merah muda atau merah.

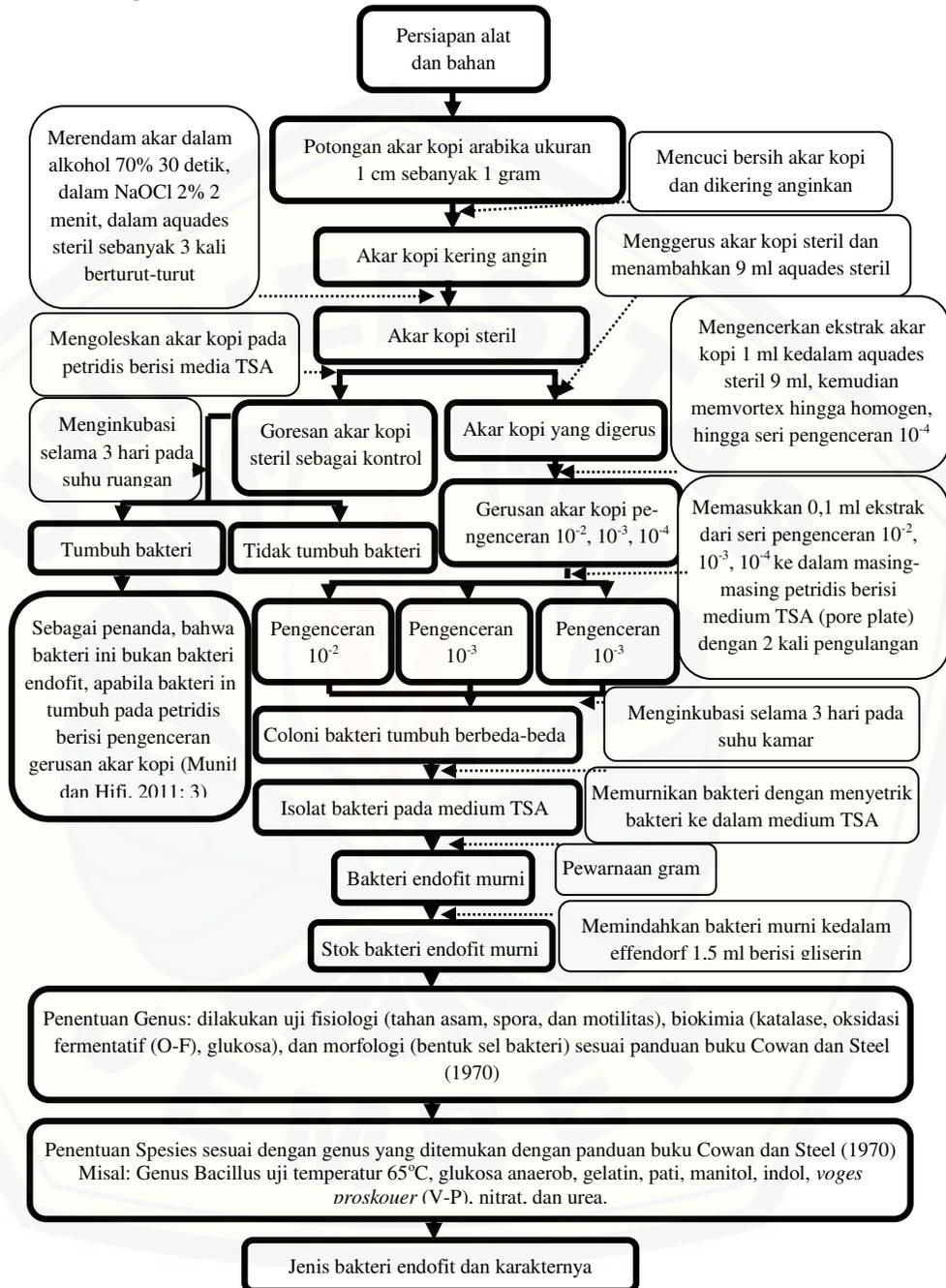
9) Uji Hidrolisis Urea

- a) Menginokulasi isolat pada medium Na dengan campuran urea dalam tabung reaksi secara aseptik
- b) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam Uji akan bernilai positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah keunguan setelah inkubasi. Hal ini merupakan indikasi bahwa isolat bakteri mampu menggunakan urea dan merubah pH menjadi media basa.

3.7.6 Identifikasi *Manual for the Identification of Medical Bacteria* (Cowan dan Steel, 1970)

Semua bakteri di uji dengan uji pewarnaan gram dan uji KOH untuk menentukan gram bakteri, kemudian bakteri tersebut ditentukan genusnya dengan melakukan uji tahan asam, spora, motilitas, katalase, glukosa, dan okidatif fermentatif (O-F), setelah memperoleh genus maka dilakukan uji sesuai dengan genus yang ditemukan, misal genus *Bacillus* maka dilakukan uji temperatur 65°C, glukosa anaerob, gelatin, pati, manitol, indol, *voges proskouer* (V-P), nitrat, dan urea, sesuai dengan buku panduan Cowan dan Steel (1970), sehingga diperoleh genus atau spesies.

3.8 Diagram Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genus/spesies bakteri endofit murni yang berhasil diisolasi dari akar tanaman kopi arabika yang terlihat sehat diantara tanaman yang menunjukkan gejala kerusakan pada lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis*. Tahap awal melakukan pengambilan sampel akar kopi yang sehat di Dusun Pondok Jeruk, Desa Sukorejo, Kecamatan Sumber Wringin, Kabupaten Bondowoso. Akar kopi arabika yang sehat ditunjukkan dengan banyaknya serabut akar dan berwarna cerah. Sampel akar kemudian di isolasi hingga mendapatkan isolat bakteri murni. Isolat tersebut kemudian diidentifikasi baik secara morfologi, fisiologi, maupun biokimia.

4.1.1 Hasil Isolasi

Isolasi merupakan kegiatan yang dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri murni. Prosedur isolasi merupakan bagian penting dalam menemukan bakteri endofit. Isolasi bakteri dilakukan di Laboratorium Sub Mikrobiologi Jurusan Pendidikan MIPA Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember. Bakteri endofit yang diperoleh adalah bakteri yang tumbuh pada hari ke-3 pada petridish gerusan akar kopi. Selama pengamatan dilakukan proses purifikasi dengan memindahkan bakteri endofit yang memiliki karakter morfologi koloni maupun morfologi tunggal berbeda satu sama lain serta berbeda dengan bakteri yang tumbuh pada kontrol ke dalam media agar yang baru, untuk mengetahui morfologi tunggal bakteri tersebut dilakukan pewarnaan gram. Isolasi bakteri dalam penelitian ini ditemukan isolat bakteri murni sebanyak 7 isolat terdiri dari 6 isolat bakteri endofit yang diberi nama SK1, SK2, SK8, SK10, SK13, SK15, dan SK17, serta 1 bakteri kontrol K1 (sebagai

kontrol), karena bakteri kontrol memiliki karakter yang berbeda dengan bakteri yang lain.

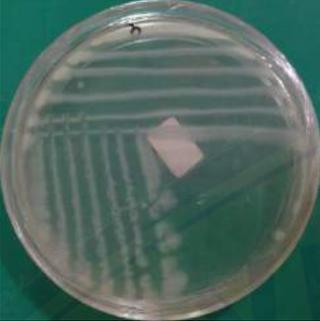
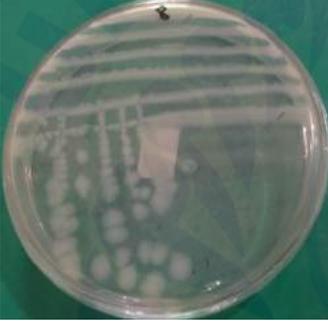
4.1.2 Hasil Identifikasi

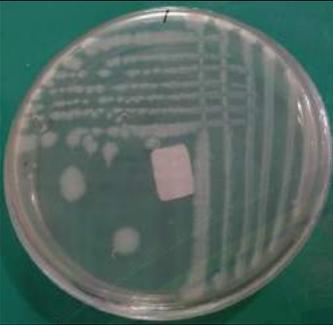
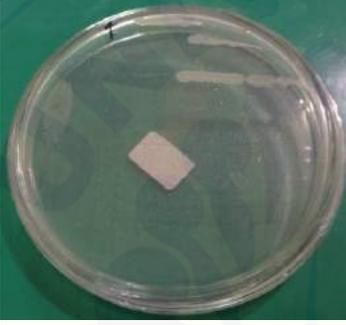
4.1.2.1 Hasil Pengamatan Morfologi Bakteri

Pengamatan morfologi bakteri adalah pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni bakteri pada medium lempeng, medium miring, medium tegak, dan medium cair. Aspek yang diamati pada pengamatan makroskopis adalah pertumbuhan bakteri, bentuk koloni, tepian koloni, elevasi serta struktur dalam koloni pada medium lempeng, sedangkan pada medium tegak, miring, dan broth hanya diamati pola tumbuh bakteri. Pengamatan mikroskopis meliputi bentuk sel, ukuran sel, dan gram sel.

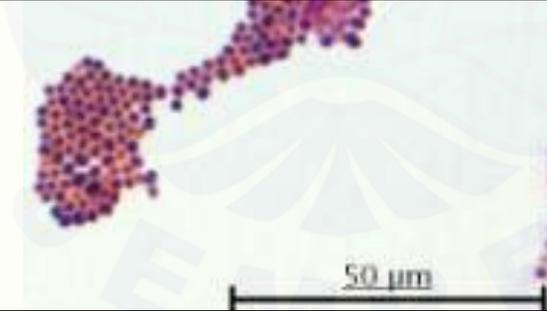
Tabel 4.1 Pengamatan Morfologi Makroskopis Bakteri

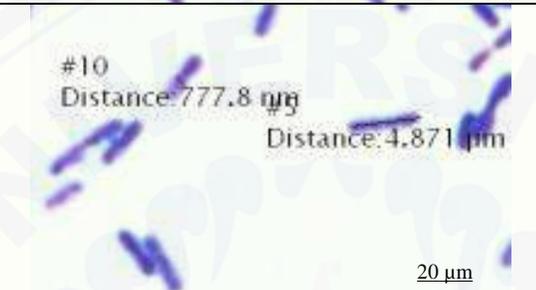
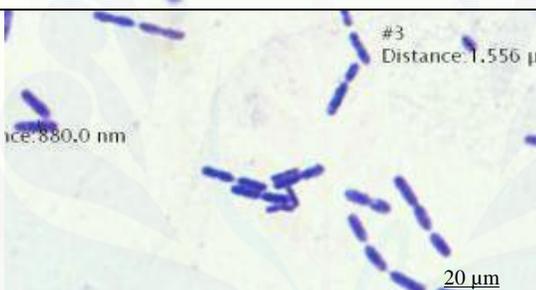
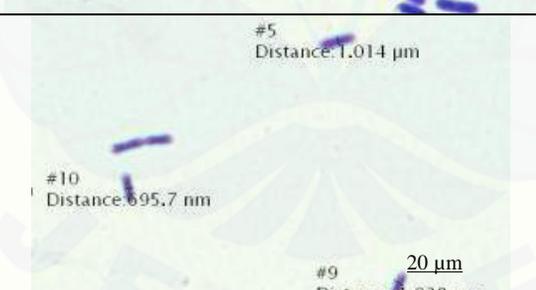
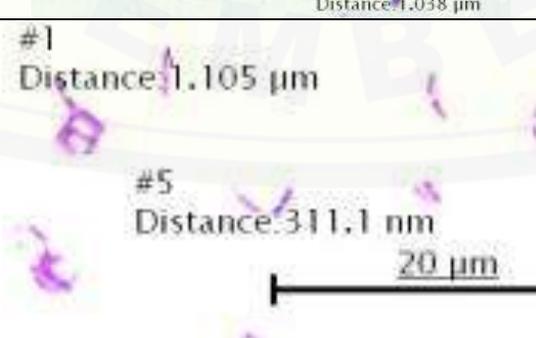
Bakteri	Makroskopis Medium Cawan	Cawan	Medium Miring	Medium Tegak	Medium Cair
KA		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>curried</i> , permukaan licin, elevasi <i>convex</i> , tepian <i>entire</i> dan struktur dalam <i>smooth</i>	<i>Filiform</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan tidak membentuk cincin, tingkat kekeruhan sedang, tidak berbau, dan membentuk endapan seperti pasir
SK1		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>circular</i> , permukaan kasar, elevasi <i>convex</i> , tepian <i>ciliate</i> dan struktur dalam	<i>Filiform</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan tidak membentuk cincin, tingkat kekeruhan sedang, tidak berbau, dan membentuk banyak

		<i>coarsely granular</i>			endapan
SK8		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>circular</i> , permukaan kasar, elevasi <i>low convex</i> , tepian <i>ciliate</i> dan struktur dalam <i>coarsely granular</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan tidak membentuk cincin, tingkat kekeruhan sedang, tidak berbau, dan membentuk banyak endapan
SK10		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>circular</i> , permukaan licin, elevasi <i>convex</i> , tepian <i>ciliate</i> dan struktur dalam <i>coarsely granular</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan membentuk cincin, tingkat kekeruhan-an sedang , tidak berbau, dan mem-bentuk banyak endapan
SK13		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>curried</i> , permukaan kasar, elevasi <i>convex papillate</i> , tepian <i>entire</i> dan struktur dalam <i>coarsely granular</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan tidak membentuk cincin, sedikit keruh, tidak berbau, dan mem-bentuk banyak endapan

SK15		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>circular</i> , permukaan kasar, elevasi <i>convex</i> , tepian <i>ciliate</i> dan struktur dalam <i>coarsely granular</i>	<i>Beaded</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan tidak membentuk cincin, tingkat kekeruhan sedang, tidak berbau, dan membentuk banyak endapan seperti pasir
SK17		Pertumbuhan diatas permukaan medium, bentuk koloni <i>irreguler</i> , permukaan kasar, elevasi <i>convex</i> , tepian <i>undulate</i> dan struktur dalam <i>opaque</i>	<i>Spreading</i>	<i>Echinulate</i>	Permukaan tidak membentuk cincin, tidak keruh, tidak berbau, dan membentuk endapan seperti pasir

Tabel 4.2 Pengamatan Morfologi Mikroskopis Bakteri

Bakteri	Makroskopis Medium Cawan	Keterangan
KA		Berbentuk coccus, ukuran $d = 1,375 - 2,268 \mu\text{m}$
SK1		Berbentuk basil, ukuran $p = 1,105 - 2 \mu\text{m}$; $d = 311,1 - 330 \text{ nm}$

<p>SK8</p>		<p>Berbentuk basil, ukuran $p = 1,100 - 3,889 \mu\text{m}$; $d = 695,7 - 837,7 \text{ nm}$</p>
<p>SK10</p>		<p>Berbentuk basil, ukuran $p = 1,650 - 6,618 \mu\text{m}$; $d = 550 - 777,8 \text{ nm}$</p>
<p>SK13</p>		<p>Berbentuk basil, ukuran $p = 1,190 - 4,488 \mu\text{m}$; $d = 800,8 - 880 \text{ nm}$</p>
<p>SK15</p>		<p>Berbentuk basil, ukuran $p = 2,200 - 3,780 \mu\text{m}$; $d = 660 \text{ nm} - 1,038 \mu\text{m}$</p>
<p>SK17</p>		<p>Berbentuk basil, ukuran $p = 1,105 - 2 \mu\text{m}$; $d = 330 - 311,1 \text{ nm}$</p>

Keterangan: p = panjang dan d = diameter

4.1.2.2 Hasil Pengamatan Fisiologi dan Biokimia

Pengamatan fisiologi bakteri meliputi pewarnaan gram, tahan asam, spora, uji motilitas, uji kebutuhan oksigen, dan uji temperatur, sedangkan pengamatan biokimia meliputi uji katalase, manitol, glukosa, glukosa anaerob, oksidatif-fermentatif (O-F), pertumbuhan ada suhu 65°C, uji hidrolisis gelatin, hidrolisis pati, indol, voges proskuer (V-P), uji reduksi nitrat, dan uji hidrolisis urea.

Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Fisiologi dan Biokimia

Uji	Bakteri						
	KA	SK1	SK8	SK10	SK13	SK15	SK17
Gram	-	+	+	+	+	+	+
Tahan Asam	-	-	-	-	-	-	-
Spora	+	+	+	+	+	+	-
Motilitas	-	d	d	d	d	d	D
Suhu 45°C	+	+	+	+	+	+	+
Suhu 65°C		-	-	-	-	-	
Kebutuhan O ₂	aerob fakultatif	aerob fakultatif	anaerob	aerob fakultatif	aerob	aerob fakultatif	anaerob
Katalase	+	+	+	+	+	+	+
Manitol		+	+	+	+	+	
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+
Glukosa Anaerob		-	-	-	+	+	
O-F	-	-	-	-	-	-	F
Gelatin		+	+	+	+	+	
Pati		-	-	+	+	-	
Indol		-	-	-	-	-	
V-P		-	-	-	-	-	
Nitrat		-	-	+	+	+	
Urea		-	-	-	-	-	

Keterangan: d = 20-70%, f = fermentatif

	berbau	berbau	berbau	berbau	berbau	berbau	berbau
Endapan	seperti pasir	banyak sekali endapan	banyak sekali endapan	banyak sekali endapan	banyak sekali endapan	banyak sekali endapan seperti pasir	seperti pasir
Gram	-	+	+	+	+	+	+
Bentuk	Cocus	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Ukuran	1,375 – 2,268 μm	p = 1,105 – 2 μm ; d = 311,1 – 330 nm	p = 1,100 – 3,889 μm ; d = 695,7 – 837,7 nm	p = 1,650 – 6,618 μm ; d = 550 – 777,8 nm	p = 1,190 – 4,488 μm ; d = 800,8 – 880 nm	p = 2,200 – 3,780 μm ; d = 660 nm – 1,038 μm	p = 1,105 – 2 μm ; d = 330 – 311,1 nm
Tahan Asam	-	-	-	-	-	-	-
Spora	+	+	+	+	+	+	-
Motilitas	-	d	d	d	d	d	D
Suhu 45°C	+	+	+	+	+	+	+
Suhu 65°C		-	-	-	-	-	
Kebutuhan O ₂	aerob fakultatif	aerob fakultatif	anaerob	aerob fakultatif	aerob	aerob fakultatif	anaerob
Katalase	+	+	+	+	+	+	+
Manitol		+	+	+	+	+	
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+
Glukosa Anaerob		-	-	-	+	+	
O-F	-	-	-	-	-	-	F
Gelatin		+	+	+	+	+	
Pati		-	-	+	+	-	
Indol		-	-	-	-	-	
V-P		-	-	-	-	-	
Nitrat		-	-	+	+	+	
Urea		-	-	-	-	-	
Hasil	-	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.

Keterangan: d = 20-70%, f = fermentatif

4.2 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genus/spesies bakteri endofit murni yang berhasil diisolasi dari tanaman kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis*. Bakteri endofit diisolasi dari akar tanaman kopi di lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis*. Tahap awal penelitian ini adalah menentukan sampel akar kopi arabika yang akan diisolasi. Akar kopi arabika tersebut diperoleh dari lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis* di Dusun Pondok Jeruk, Desa Sukorejo, Kecamatan Sumber Wringin, Kabupaten Bondowoso. Akar yang digunakan berasal dari tanaman kopi arabika yang tidak menunjukkan gejala kerusakan akibat terserang nematoda *Radopholus similis* di antara tanaman kopi arabika yang terlihat mengalami kerusakan akibat terserang nematoda *Radopholus similis*. Ciri-ciri tanaman kopi arabika yang tidak menunjukkan gejala kerusakan yaitu memiliki banyak serabut akar dan berwarna cerah serta daun berwarna hijau dan lebat. Kemudian sampel akar tersebut dibawa ke laboratorium untuk diisolasi.

4.2.1 Isolasi Bakteri

Purifikasi dilakukan pada bakteri yang memiliki karakter morfologi makroskopis dan mikroskopis yang berbeda antara satu dengan yang lain. Pengamatan karakter mikroskopis dilakukan dengan pengamatan gram. Bakteri yang sudah murni dilihat karakternya antara bakteri yang tumbuh pada medium kontrol dengan bakteri yang tumbuh pada medium akar yang digerus, bakteri yang berbeda dengan kontrol dinamakan bakteri endofit. Hal ini sesuai dengan proses isolasi yang dilakukan oleh Munif dan Hipi (2011: 2), yang menyatakan bahwa bakteri yang tumbuh pada kontrol merupakan acuan bahwa bakteri tersebut bukan bakteri endofit, apabila bakteri tersebut tumbuh pada gerusan akar dalam *petridish*. Bakteri yang sudah murni kemudian dilakukan identifikasi baik secara morfologi, fisiologi,

maupun biokimia. Selanjutnya bakteri dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah berisi media TSB dan Gliserol 80% kemudian disimpan pada suhu -4°C .

Isolat bakteri murni yang berhasil didapat adalah 7 isolat, terdiri dari 6 bakteri endofit dan 1 bakteri kontrol. Selanjutnya bakteri ini diidentifikasi. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui karakter dari masing-masing bakteri hingga menentukan genus/spesies bakteri tersebut.

4.2.2 Identifikasi Bakteri

4.2.2.1 Pengamatan Karakter Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan dengan mengamati morfologi koloni pada berbagai medium dan mengamati morfologi tunggal. Pengamatan morfologi koloni bakteri meliputi pengamatan pada medium lempeng, tegak, miring, dan cair (*broth*). Bentuk koloni pada medium lempeng yang diamati yaitu pertumbuhan, permukaan koloni, bentuk koloni, elevasi, tepi dan struktur dalam. Pada medium tegak dan miring hanya dilakukan pengamatan bentuk koloni dan pada medium cair (*broth*) dilakukan pengamatan kekeruhan, bau dan endapan. Selain itu, dilakukan pengamatan morfologi tunggal meliputi bentuk bakteri dan ukuran bakteri.

Pengamatan morfologi makroskopis pada medium lempeng, semua bakteri tumbuh diatas permukaan medium. Bakteri KA dan SK10 memiliki permukaan koloni licin, sedangkan bakteri SK8, SK13, SK15, dan SK17 memiliki permukaan koloni kasar. Bakteri KA dan SK13 memiliki bentuk koloni *curied* (bentuk koloni keriting, berkerut, seperti rantai sejajar yang bergelombang), bakteri SK1, SK8, SK10, dan SK15 memiliki bentuk koloni *circular* (bentuk koloni bulat), sedangkan SK17 memiliki bentuk *irreguler* (bentuk koloni tidak beraturan). Bakteri KA, SK1, SK10, dan SK15 memiliki elevasi *convex* (cembung), bakteri SK8 memiliki elevasi *low convex* (sedikit cembung) dan bakteri SK13 memiliki elevasi *convex papillate* (bentuk cembung dengan tonjolan tumpul). Bakteri KA dan SK 13 memiliki bentuk tepi *entire*, bakteri SK1, SK8,

SK10, dan SK15 memiliki bentuk tepi *ciliate*, serta bakteri SK17 memiliki bentuk tepi *undulate*. Bakteri SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK15 memiliki struktur dalam *coarsely granular*, bakteri KA memiliki struktur dalam *smooth*, dan bakteri SK17 memiliki struktur dalam *opaque*.

Pengamatan morfologi pada medium miring, bakteri KA dan SK1 memiliki bentuk *filiform*, bakteri SK8, SK10, dan SK13 memiliki bentuk *effuse*, SK15 memiliki bentuk *beaded*, bakteri SK17 memiliki bentuk *spreading*. Pada pengamatan morfologi pada medium tegak semua bakteri menunjukkan bentuk *echinulate*. Pengamatan morfologi koloni pada medium cair (*broth*), bakteri KA, SK1, SK8, SK13, SK15, dan SK17 pada permukaan medium tidak membentuk cincin, sedangkan SK 10 membentuk cincin pada permukaan medium. Bakteri KA, SK1, SK10, dan SK15 memperlihatkan kekeruhan sedang, bakteri SK10 dan SK13 memperlihatkan sedikit kekeruhan, sedangkan SK17 tidak memperlihatkan kekeruhan, serta semua bakteri pada pengamatan ini tidak menunjukkan adanya bau. Bakteri KA dan SK17 memiliki endapan seperti pasir, bakteri SK1, SK8, SK10, dan SK13 memiliki banyak endapan, sedangkan bakteri SK15 memiliki banyak endapan seperti pasir.

Pengamatan morfologi tunggal, bakteri KA berbentuk coccus memiliki ukuran 1,375 – 2,268 μm , sedangkan bakteri SK1, SK8, SK10, SK13, SK15, dan SK17 berbentuk basil dengan ukuran yang berbeda-beda, bakteri SK1 memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 311,1 – 330 nm, bakteri SK8 memiliki ukuran panjang 1,100 – 3,889 μm dan diameter 695,7 – 837,7 nm, bakteri SK10 memiliki ukuran panjang 1,650 – 6,618 μm dan diameter 550 – 777,8 nm, bakteri SK13 memiliki ukuran panjang 1,190 – 4,488 μm dan diameter 800,8 – 880 nm, bakteri SK15 memiliki ukuran panjang 2,200 – 3,780 μm dan diameter 660 nm – 1,038 μm , bakteri SK17 memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 330 – 311,1 nm.

4.2.2.2 Pengamatan Karakter Fisiologi

Pada pengamatan fisiologi bakteri terdapat beberapa uji yang dilakukan, yaitu pewarnaan gram, pewarnaan tahan asam, pewarnaan spora, uji motilitas, uji temperatur, dan uji kebutuhan oksigen.

a. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif. Jika dilihat di bawah mikroskop, bakteri gram positif akan berwarna ungu, karena dapat menahan kompleks pewarna primer kristal violet sampai akhir prosedur pewarnaan. Bakteri gram negatif akan berwarna merah, karena kehilangan kompleks warna kristal violet dengan pembilasan alkohol, lalu terwarnai oleh pewarna tandingan berupa safranin (Jawetz *et al.*, 1996: 34).

Perbedaan reaksi kedua golongan bakteri tersebut terhadap pewarnaan gram disebabkan bakteri gram positif memiliki kandungan lipid sedikit dan dinding sel tebal yang akan menyusut pada saat pembilasan alkohol, sehingga pori-porinya menutup dan permeabilitas berkurang, serta mencegah keluarnya kompleks pewarna primer pada saat pemucatan, sehingga ketika diberi safranin, sel bakteri tidak terpengaruh dan tetap berwarna biru/ungu. Sedangkan dinding sel bakteri gram negatif mengandung banyak lipid yang larut dalam alkohol pada saat pembilasan. Larutnya lipid memperbesar pori-pori dinding sel dan menyebabkan proses pemucatan berlangsung cepat, sehingga larutan kristal violet di dalam tubuh akan terekstraksi juga, hal ini menyebabkan bakteri gram negatif kehilangan warna dan ketika diberi safranin, sel bakteri akan menyerap warna safranin sehingga menjadi warna merah (Pelczar, 1986: 117).

Berdasarkan hasil pengamatan diketahui hanya satu bakteri bersifat gram negatif dan enam bakteri lainnya bersifat positif. Bakteri KA berbentuk coccus menunjukkan warna merah yang artinya bersifat gram negatif. Bakteri SK1, SK8,

SK10, SK13, SK15, dan SK17 berbentuk basil menunjukkan warna biru yang artinya bersifat gram positif.

b. Pewarnaan Tahan Asam

Prinsip kerja pewarnaan tahan asam hampir sama dengan pewarnaan gram, pada bakteri yang tahan asam setelah diberi karbol fuksin, kemudian diberi alkohol asam karena bakteri tahan asam maka tidak menunjukkan reaksi terekstraksi dan warna karbol fuksin tetap berada dalam tubuh sehingga ketika di tambah *methylen blue* bakteri tidak bereaksi, ketika diamati pada mikroskop bakteri menunjukkan warna merah. Sifat tahan asam pada bakteri disebabkan adanya asam mikolat, sehingga disebut bakteri tahan asam. Sedangkan bakteri yang tidak tahan asam pada saat diberi alkohol asam mengalami reaksi terekstraksi sehingga pewarna karbol fuksin menjadi luntur, ketika diberi *methylen blue* pewarna ini akan masuk dalam tubuh bakteri dan ketika diamati pada mikroskop menunjukkan warna biru (Pelczar dan E., 1986: 84).

Berdasarkan hasil pengamatan diketahui tidak ada bakteri yang bersifat tahan asam. Semua bakteri menunjukkan warna biru. Bakteri KA, SK1, SK8, SK10, SK13, SK15, dan SK17 menunjukkan sifat bakteri tidak tahan asam.

c. Pewarnaan Spora

Spora merupakan bentuk kehidupan yang paling resisten, sehingga mampu bertahan dalam debu dan tanah selama bertahun-tahun. Ketahanan spora disebabkan adanya selubung spora yang keras dan tebal. Untuk dapat mewarnai spora, diperlukan pemanasan agar pewarna dapat menembus selubung spora. Jika pewarna tersebut sudah masuk ke dalam spora, maka pewarna tersebut akan sulit dihilangkan (Jawetz *et al.*, 1996: 31). Larutan yang digunakan adalah hijau malakit. Bakteri penghasil spora akan mengikat kuat senyawa hijau malakit, ketika dilakukan pewarnaan selanjutnya dengan safranin, sel spora tidak dapat berikatan karena sudah berikatan dengan hijau malakit. Sehingga warna spora bakteri menjadi hijau. Bakteri yang tidak memiliki spora cenderung tidak tahan terhadap pewarnaan, karena hanya memiliki sel

vegetatif. Ketika sel vegetatif diwarnai dengan hijau malakit, sel tersebut dapat mengikat warna namun setelah pencucian, warna tersebut luntur disebabkan tidak berikatan kuat dengan pewarna hijau malakit. Kemudian dilakukan pengecatan dengan safranin dan sel berikatan dengan safranin, sehingga ketika diamati pada mikroskop sel terlihat berwarna merah muda.

Berdasarkan hasil pengamatan hanya satu bakteri yang tidak mampu menghasilkan spora, sedangkan enam bakteri lainnya mampu menghasilkan spora. Bakteri SK17 tidak mampu menghasilkan spora. Bakteri KA, SK1, SK8, SK10, SK13 dan SK15 mampu menghasilkan spora.

d. Uji Motilitas

Uji motilitas bertujuan untuk melihat pergerakan bakteri. Metode yang digunakan adalah metode *hanging drop*. Preparat yang digunakan adalah preparat *hanging drop*. Suspensi bakteri diteteskan dalam *hanging drop* kemudian diamati dibawah mikroskop. Indikator bakteri dikatakan motil apabila 100% bakteri terlihat bergerak atau paling sedikit 20-70% dari jumlah keseluruhan bakteri terlihat bergerak (ada yang bergerak cepat dan ada yang bergerak lambat dalam berpindah tempat), sedang nonmotil apabila tidak ada pergerakan atau 0-20% dari jumlah keseluruhan bakteri terlihat bergerak (Cowan dan Stell, 1970: 55). Berdasarkan hasil pengamatan semua bakteri bersifat motil. Bakteri KA, SK1, SK8, SK10, SK13, SK15, dan SK17 bersifat motil karena menunjukkan 20-70 % bakteri memperlihatkan pergerakan.

e. Uji Temperatur

Uji temperatur bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap pertumbuhan bakteri dan uji temperatur pada suhu 65°C merupakan salah satu uji yang digunakan untuk menentukan spesies dari genus bakteri bacillus (Cowan dan Steel, 1970: 58). Pada uji ini isolat bakteri ditanam pada medium NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 65°C. Berdasarkan hasil pengamatan semua isolat bakteri dapat tumbuh pada suhu 37°C. Sedangkan uji temperatur pada suhu 65°C hanya digunakan untuk menguji genus Bacillus. Terdapat 5 isolat bakteri genus

bacillus yaitu bakteri SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK 15, semua bakteri ini tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C.

f. Uji Kebutuhan Oksigen

Uji kebutuhan oksigen bertujuan untuk mengelompokkan jenis bakteri berdasarkan kebutuhan oksigennya. Terdapat empat jenis golongan yaitu aerob (organisme yang membutuhkan oksigen), anaerob (organisme yang tidak membutuhkan oksigen), aerob fakultatif (organisme yang tumbuh dalam keadaan aerob maupun anaerob) dan mikroaerofil (Pelczar dan E., 1989: 141). Berdasarkan hasil pengamatan terdapat empat bakteri bersifat aaerob fakultatif, dua bakteri bersifat anaerob, dan satu bakteri bersifat aerob. Hal ini dilihat dari pertumbuhan bakteri pada medium cair (*broth*). Bakteri KA, SK1, SK10, dan SK15 tumbuh pada dasar dan permukaan medium sehingga dikatakan bersifat anaerob fakultatif yaitu pertumbuhan bakteri ini membutuhkan oksigen maupun tidak membutuhkan oksigen. Bakteri SK8 dan SK17 bersifat anaerob artinya bakteri ini pertumbuhannya tidak membutuhkan oksigen karena pertumbuhan bakteri hanya pada dasar medium, sedangkan bakteri SK13 bersifat aerob artinya bakteri ini pertumbuhannya membutuhkan oksigen, sistem enzimnya membutuhkan oksigen sebagai elektron aseptor pada proses fosforilasi oksidatifnya (Cappuccino dan Sherman, 1983 dalam Puspitasari *et al.*, 2012: 1). Bakteri SK13 dimungkinkan memperoleh oksigen dari tanaman inangnya, karena terdapat empat besar unsur-unsur penyusun tubuh tanaman yaitu karbon, hidrogen, oksigen, dan nitrogen. Tiga besar pertama tersedia dalam bentuk karbondioksida, air, dan oksigen (Sari dan Prayudyaningsih, 2015: 52). Unsur-unsur tersebut diperoleh dari udara dan hasil fotosintesis yang disimpan dalam tubuh tanaman, serta unsur tersebut merupakan unsur pembangun karbohidrat dan lemak (Rahman, (tanpa tahun): 3).

4.2.2.3 Pengamatan Karakter Biokimia

Bakteri dapat diidentifikasi dengan melihat reaksi biokimia yang ditunjukkan oleh bakteri tersebut. Dalam penelitian ini dilakukan beberapa uji biokimia yaitu uji fermentasi gula, uji katalase, uji oksidatif-fermentatif (O-F), uji hidrolisis gelatin, uji hidrolisis pati, uji indol, uji *voges proskour* (V-P), uji reduksi nitrat dan uji hidrolisis urea.

a. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat tertentu dan menghasilkan alkohol, asam serta gas (Jutono *et al.*, 1980: 90). Dalam uji ini digunakan media pertumbuhan cair yang mengandung karbohidrat tertentu (glukosa dan manitol). Terbentuknya asam akan ditunjukkan dengan perubahan warna medium, sedangkan terbentuknya gas ditunjukkan dengan adanya gelembung pada tabung durham (Jutono, 1980: 90). Pada penelitian ini digunakan dua uji fermentasi gula yaitu uji fermentasi glukosa dan uji fermentasi manitol. Berdasarkan hasil penelitian bahwa semua bakteri yang diuji (bakteri KA, SK1, SK8, SK10, SK13, SK15, dan SK17) menunjukkan dapat memfermentasi glukosa. Sedangkan uji fermentasi manitol hanya dilakukan pada bakteri genus *Bacillus* yaitu bakteri SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK15. Semua bakteri *Bacillus* ini dapat memfermentasi manitol. Hal ini terlihat dari perubahan warna medium, awal medium berwarna merah setelah diinkubasi medium berubah warna menjadi kuning.

b. Uji Reduksi Katalase

Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1990 dalam Dewi, 2013: 142). Pengujian ini dilakukan dengan menginokulasi bakteri terlebih dahulu pada medium miring selama 48 jam, setelah inkubasi kemudian memasukkan 2-3 ml larutan H_2O_2 3% kedalamnya. Pada pengamatan semua bakteri baik bakteri

KA, SK1, SK8, SK10, SK13, SK15, dan SK17 menunjukkan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri ini dapat menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

c. Uji Oksidatif Fermentatif (O-F)

Uji oksidatif fermentatif digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri untuk memetabolisme karbohidrat secara oksidatif atau fermentatif (Lay, 1994 dalam Pastra, 2012: 81). Oksidatif akan terjadi pada bakteri aerob yaitu pada tabung yang tidak ditutup dengan paraffin. Hasil positif jika terbentuk warna kuning pada tabung yang tidak ditutup karena hanya akan memproduksi reaksi asam pada tabung yang tidak ditutup. Sedangkan fermentatif terjadi pada bakteri anaerob yaitu tabung yang ditutup dengan paraffin maupun tidak ditutup. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning, karena bakteri tersebut menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup maupun tidak. Proses fermentasi glikosa akan diubah menjadi glukosa G-Phospat yang kemudian dirombak menjadi asam piruvat dan oksidase akan merubah glukosa menjadi asam piruvat (Cowan dan Steel, 1970: 23). Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan dengan cara tusukan bakteri ke dalam 2 tabung yang berisi medium O-F. Setelah dilakukan penginokulasian, salah satu tabung ditutup dengan parafin dan diinkubasi selama 14 hari (Cowan dan Steel, 1970: 151).

Berdasarkan hasil pengamatan hanya satu bakteri yang memiliki sifat fermentatif yaitu bakteri SK17. Bakteri SK17 memperlihatkan perubahan warna mulai dari hijau menjadi kuning pada tabung yang ditutup maupun yang tidak ditutup. Bakteri ini dapat menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup maupun tidak. Sedangkan bakteri KA, SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK15 tidak menunjukkan perubahan warna, bakteri ini tidak dapat menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup maupun tidak.

d. Uji Hidrolisis Gelatin

Hidrolisis gelatin oleh bakteri dikatalisis oleh ekoenzim yang disebut gelatinase. Gelatin adalah protein yang diperoleh dari tulang, tulang rawan atau tulang ikat hewani lainnya. Gelatin yang dicerna tidak mampu membentuk gel dan bersifat cair (Lay, 1994 dalam Pastra, 2012: 81). Uji hidrolisis gelatin ini hanya dilakukan pada genus *Bacillus* yang ditemukan. Berdasarkan hasil penelitian bahwa semua bakteri genus *Bacillus* yang ditemukan (SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK15) dapat menghidrolisis gelatin, ditunjukkan dengan mencairnya medium gelatin pada bakteri.

e. Uji Hidrolisis Pati

Uji hidrolisis pati bertujuan untuk mengetahui adanya enzim amilase pada bakteri. Hidrolisis pati dikatakan positif apabila terbentuk zona bening di sekitar koloni yang ditetsi oleh yodium. Berdasarkan hasil pengamatan bakteri SK10 dan SK13 menunjukkan hasil positif dengan adanya zona bening, sedangkan bakteri SK1, SK8, dan SK15 menunjukkan hasil negatif dengan tidak terbentuknya zona bening. Hal ini menunjukkan bahwa SK10 dan SK13 adanya enzim amilase. Enzim ini berfungsi mengubah polisakarida pada medium menjadi monosakarida dan disakarida, sehingga terbentuk zona bening di sekeliling koloni bakteri. Yodium berfungsi memperjelas zona bening yang terbentuk karena akan menyisip pada pada rantai polisakarida yang tidak terhidrolisis sehingga media akan menyerap warna pereaksi yang berwarna coklat. Sebaliknya pada rantai polisakarida yang telah terhidrolisis oleh aktivitas amilase, pereaksi tidak bisa menyisip sehingga media tetap berwarna bening.

f. Uji Indol

Uji indol bertujuan untuk mengetahui adanya enzim triptopanase pada bakteri. Indol dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri yang tumbuh pada medium yang mengandung asam amino triptofan dengan menunjukkan bau busuk dan cara menentukan adanya indol adalah dengan menggunakan pengujian *Kovac's* (Jutono *et*

al., 1980: 91). Indikator positif ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna merah pada permukaan biakan apabila ditambahkan 0,5 ml *kovac's*. Cincin ini menandakan bahwa indol yang terbentuk bereaksi dengan pereaksi *kovac's*. Pengujian ini hanya dilakukan pada bakteri genus *Bacillus* yang diperoleh. Berdasarkan pengamatan bakteri SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK15 yang diuji tidak menunjukkan adanya indol positif. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak menghasilkan enzim triptopanase.

g. Uji *Voges Proskauer* (V-P)

Uji *Voges Proskauer* (V-P) bertujuan untuk mengetahui bakteri yang menghasilkan produk netral seperti asetoin dari hasil fermentasi glukosa. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah tua yang menunjukkan adanya kandungan asetoin yang diproduksi oleh bakteri dalam larutan KOH 40% dalam akuades steril dan *á-naphthol* 5% dalam ethanol, yang bertindak sebagai katalis (Hadioetomo, 1990 dalam Dewi, 2013: 143). Uji ini hanya dilakukan pada bakteri genus *Bacillus* yang ditemukan. Berdasarkan hasil pengamatan tidak satupun yang menunjukkan dapat menghasilkan produk netral seperti asetoin. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada larutan dari kuning menjadi merah tua.

h. Uji Reduksi Nitrat

Uji reduksi nitrat bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut dapat mengubah garam-garam nitrat menjadi nitrit (Jutono *et al.*, 1980: 92). Indikator positif pada uji ini adalah terbentuknya warna merah pada medium cair yang dicampur dengan larutan 1ml asam sulfanilat dan 1 ml α -naphthylamine (Jutono *et al.*, 1980: 109). Uji ini hanya dilakukan pada bakteri genus *Bacillus* yang ditemukan. Berdasarkan hasil pengamatan bakteri SK10, SK13, dan SK15 menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna merah pada medium cair, karena bakteri ini mampu mengubah garam-garam nitrat menjadi nitrit. Sedangkan bakteri SK1 dan

SK8 menunjukkan hasil negatif dengan tidak membentuk warna merah, karena bakteri ini tidak mampu mengubah garam-garam nitrat menjadi nitrit.

i. Uji Hidrolisis Urea

Uji hidrolisis urea bertujuan untuk mengetahui bakteri menghasilkan enzim urease atau tidak. Uji ini hanya dilakukan pada bakteri SK1, SK8, SK10, SK13, dan SK15. Indikator positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna fenol red menjadi kuning, menandakan bahwa urea terdegradasi menjadi amonia karbondoksida oleh enzim urease melalui reaskis hidrolisis (Cappucino dan Sherman, 2005). Berdasarkan hasil pengamatan, semua bakteri bersifat negatif karena tidak dapat menghidrolisis urea.

4.2.2.4 Karakteristik Masing-Masing Genus dan Spesies Isolat Bakteri

Berdasarkan hasil identifikasi ditemukan 1 bakteri nonendofit dan 6 bakteri endofit. Bakteri nonendofit belum dapat diidentifikasi. Sedangkan 6 bakteri endofit dapat diidentifikasi, 5 bakteri tergolong genus *Bacillus* dan 1 bakteri tergolong genus *Listeria*. Semua bakteri dilakukan identifikasi untuk mengetahui perbedaan antara bakteri nonendofit dengan bakteri endofit yang berhasil di isolasi. Berikut merupakan perbedaan antara bakteri-bakteri tersebut:

a. Bakteri Nonendofit (KA)

Bakteri nonendofit diisolasi dari permukaan akar, bakteri ini tidak dapat diidentifikasi karena hasil pengamatan tidak sesuai dengan buku panduan Cowan dan Steel (1970: 76). Pada pengamatan mikroskopis bakteri ini berbentuk coccus memiliki diameter 1,375 – 2,268 μm . Sedangkan pada pengamatan morfologi koloni pada medium lempeng, bakteri nonendofit ini tumbuh di atas permukaan medium, permukaan koloni licin, memiliki bentuk koloni *curved*, elevasi *convex*, tepi *entire* dan struktur dalam *smooth*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *filiform*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada

medium cair dengan pertumbuhan pada permukaan tidak membentuk cincin, memperlihatkan kekeruhan sedang, tidak berbau, endapan seperti pasir.

Pada pengamatan fisiologi bakteri ini bersifat gram positif, tidak tahan terhadap asam, memiliki spora, dan bersifat nonmotil, serta bersifat aerob fakultatif. Sedangkan pada pengamatan biokimia, bakteri ini memiliki sifat katalase positif (bakteri ini menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen), dapat memfermentasi glukosa, dan tidak memiliki sifat oksidasi-fermentasi karena tidak dapat menghasilkan reaksi asam pada tabung yang tertutup maupun tidak. Menurut Cowan dan Steel (1970: 76) bahwa bakteri gram negatif berbentuk coccus ada tiga yaitu genus *Neisseria*, *Gemella*, dan *Acinetobacter*, sedangkan ketika dicocokkan dengan genus tersebut bakteri kontrol memiliki satu perbedaan yaitu bakteri nonendofit menghasilkan spora, sehingga bakteri nonendofit tidak dapat diidentifikasi.

b. Bakteri Endofit SK1, SK8, SK10, dan SK15 (Genus *Bacillus*)

Klasifikasi genus *Bacillus*

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>Bacillus</i> sp. (itis.gov, 2016)

Isolat bakteri SK1, SK8, SK10, dan SK15 diduga tergolong genus *Bacillus*. Bakteri ini ditemukan pada jaringan akar kopi dan termasuk bakteri endofit. Hal ini sesuai dengan pendapat Iftita (2014: 26), bahwa genus *Bacillus* dapat ditemukan di berbagai lokasi seperti tanah, danau, dan laut. Selain itu, genus *Bacillus* banyak ditemukan oleh peneliti sebagai bakteri endofit, beberapa di antaranya adalah bakteri

Bacillus subtilis yang ditemukan pada tanaman kacang tanah oleh Arios (2014: 180), *Bacillus brevis* berhasil diisolasi dari rimpang temulawak oleh Imawati (2015: xvii), genus *Bacillus* yang ditemukan pada tanaman mahkota dewa oleh Izza (2011: xiii), *Bacillus cereus* dan *Bacillus sp.* ditemukan pada tanaman bawang merah oleh Resti (2013: 177), *Bacillus sp.* ditemukan pada tanaman jagung oleh Saylendra dan Firnia (2013: 22), dan 32 jenis bakteri *Bacillus* ditemukan pada tanaman lada hitam oleh Aravind *et al.* (2009: 211).

Pada pengamatan morfologi mikroskopis bakteri SK1, SK8, SK10 dan SK15 memiliki bentuk yang sama yaitu basil, namun memiliki ukuran yang berbeda-beda. Bakteri SK1 memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 311,1 – 330 nm, bakteri SK8 memiliki ukuran panjang 1,100 – 3,889 μm dan diameter 695,7 – 837,7 nm, bakteri SK10 memiliki ukuran panjang 1,650 – 6,618 μm dan diameter 550 – 777,8 nm, dan bakteri SK15 memiliki ukuran panjang 2,200 – 3,780 μm dan diameter 660 nm – 1,038 μm . Hal ini sesuai dengan Holt, *et al.* (1994: 559) bahwa genus *Bacillus* berbentuk basil dengan ukuran panjang 1,200 – 10 μm dan diameter 500 – 2.500 nm.

Pada pengamatan morfologi koloni bakteri pada medium lempeng, medium mirin, medium tegak, dan medium cair, memiliki sifat yang berbeda-beda, yaitu:

1. Bakteri SK1 tumbuh diatas permukaan medium, permukaan koloni kasar, bentuk koloni *circular*, elevasi *convax*, tepi *ciliate* dan struktur dalam *coarsely granular*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *filiform*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada medium cair dengan pertumbuhan pada permukaan tidak membentuk cincin, memperlihatkan kekeruhan sedang, tidak berbau, banyak sekali endapan.
2. Bakteri SK8 tumbuh diatas permukaan medium, permukaan koloni kasar, bentuk koloni *circular*, elevasi *low convex*, tepi *ciliate* dan struktur dalam *coarsely granular*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *effuse*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada

medium cair dengan memperlihatkan sedikit kekeruhan, tidak berbau, banyak sekali endapan.

3. Bakteri SK10 tumbuh diatas permukaan medium, permukaan koloni licin, bentuk koloni *circular*, elevasi *convax*, tepi *ciliate* dan struktur dalam *coarsely granular*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *effuse*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada medium cair dengan pertumbuhan pada permukaan membentuk cincin, memperlihatkan kekeruhan sedang, tidak berbau, banyak sekali endapan.
4. Bakteri SK15 tumbuh diatas permukaan medium, permukaan koloni kasar, bentuk koloni *circular*, elevasi *convax*, tepi *ciliate*, dan struktur dalam *coarsely granular*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *beaded*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada medium cair dengan pertumbuhan pada permukaan tidak membentuk cincin, memperlihatkan kekeruhan sedang, tidak berbau, banyak sekali endapan.

Pada pengamatan fisiologi bakteri SK1, SK8, SK10, dan SK15 memiliki kesama dengan teori yang dimiliki Holt, *et al.* (1994: 559) maupun Cowan dan Steel (1970: 46) yaitu bakteri ini bersifat gram positif, tidak tahan terhadap asam, memiliki spora, dan bersifat motil. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu ruangan (37°C) dan tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C. Namun, bakteri-bakteri ini memiliki perbedaan yaitu bakteri SK1, SK10 dan SK15, sedangkan bakteri SK8 bersifat anaerob. Sedangkan pada pengamatan biokimia bakteri SK1, SK8, SK10, dan SK15 memiliki kesamaan yaitu bersifat positif pada uji katalase, uji fermentasi glukosa dan manitol, uji hidrolisis gelatin, dan bersifat negatif pada uji oksidatif fermentatif, uji indol, uji V-P, uji urea, dan tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C. Perbedaannya yaitu bakteri SK1, SK8, dan SK10 bersifat negatif pada uji glukosa anaerob, sedangkan bakteri SK13 dan SK15 bersifat positif pada uji glukosa anaerob. Bakteri SK1 dan SK8 dapat menghidrolisis pati dan bersifat negatif pada uji nitrat, sedangkan bakteri SK10, SK13, dan SK15 tidak dapat menghidrolisis pati dan bersifat positif pada uji nitrat.

Bakteri endofit jenis *Bacillus* diketahui mampu menghasilkan zat-zat kimia yang dapat menginduksi ketahanan tanaman terhadap nematoda, zat tersebut adalah kitinase, asam salisilat, katalase, proksidase, dan dapat memicu pertumbuhan tanaman dengan menghasilkan fitohormon seperti IAA (Harni *et al.*, 2012 dalam Asiyah, 2015: 32; Saylendera dan Firnia, 2013:23), serta memiliki kemampuan sebagai antagonis, pelarut fosfat, penambat nitrogen, sekresi enzim protease dan selulase, serta memproduksi hidrogen sianida (HCN) (Saylendera dan Firnia, 2013:23). Selain itu, genus *Bacillus* juga merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase, lipase, protease dan selulase yang dibutuhkan dalam perombakan senyawa organik seperti karbohidrat, selulosa, lipid, dan protein menjadi bentuk yang lebih sederhana (Iftita, 2014: 26).

c. Bakteri Endofit SK13 (*Bacillus circulans* SK13)

Klasifikasi species *Bacillus circulans*

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>Bacillus circulans</i> (itis.gov, 2016)

Isolat bakteri SK13 diduga tergolong spesies *Bacillus circulans*. Bakteri ini ditemukan pada jaringan akar kopi dan termasuk bakteri endofit. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Suryadi (2014: 881) bahwa ditemukan bakteri endofit *Bacillus circulans* pada tanaman padi. Selain itu, bakteri *Bacillus circulans* juga ditemukan pada tanaman tomat oleh Mehta *et al.* (2014: 1).

Pada pengamatan morfologi mikroskopis bakteri ini berbentuk basil dengan ukuran panjang 1,190 – 4,488 μm dan diameter 800,8 – 880 nm. Hal ini sesuai

dengan Holt, *et al.* (1994: 559) bahwa genus *Bacillus* berbentuk basil dengan ukuran panjang 1,200 – 10 μm dan diameter 500 – 2.500 nm. Sedangkan berdasarkan pengamatan morfologi koloni pada medium lempeng, bakteri ini tumbuh diatas permukaan medium, permukaan koloni kasar, bentuk koloni *curried*, tepi *entire*, elevasi *convex papillate* dan struktur dalam *coarsely granular*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *effuse*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada medium cair dengan pertumbuhan pada permukaan tidak membentuk cincin, memperlihatkan sedikit kekeruhan, tidak berbau, banyak sekali endapan.

Pada pengamatan fisiologi bakteri *Bacillus circulans* memiliki kesamaan dengan teori yang dimiliki Holt, *et al.* (1994: 559) maupun Cowan dan Steel (1970: 46) yaitu bakteri ini bersifat gram positif, tidak tahan terhadap asam, memiliki spora, bersifat motil, dan bersifat aerob dimungkinkan bakteri ini memperoleh oksigen dari tanaman inangnya, karena terdapat empat besar unsur-unsur penyusun tubuh tanaman yaitu karbon, hidrogen, oksigen, dan nitrogen. Tiga besar pertama tersedia dalam bentuk karbondioksida, air, dan oksigen (Sari dan Prayudyaningsih, 2015: 52). Unsur-unsur tersebut diperoleh dari udara dan hasil fotosintesis yang disimpan dalam tubuh tanaman, serta unsur tersebut merupakan unsur pembangun karbohidrat dan lemak (Rahman, (tanpa tahun): 3). Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu ruangan (37°C) dan tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C . Sedangkan pada pengamatan biokimia, bakteri ini memiliki sifat katalase positif karena terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, selain itu dapat memfermentasi glukosa dan manitol, bersifat anaerob pada medium glukosa, tidak memiliki sifat oksidatif fermentatif karena tidak dapat menghasilkan reaksi asam pada tabung yang tertutup maupun tidak, mampu menghidrolisis gelatin, mampu menghidrolisis pati karena bakteri ini memiliki enzim amilase, bersifat indol negatif karena tidak memiliki enzim tiptopanase sehingga pada uji indol tidak menunjukkan

terbentuknya cincin, pada uji V-P tidak menghasilkan produk netral seperti asetoin sehingga uji V-P bersifat negatif, uji hidrolisis urea bersifat negatif karena bakteri ini tidak dapat menghasilkan enzim urease sehingga pada pengamatan urea tidak terdegradasi menjadi amonia karbondioksida, bersifat nitrat positif karena bakteri ini mampu mengubah garam-garam nitrat menjadi nitrit ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah pada medium cair ketika dicampur dengan larutan 1m asam sulfanilat dan 1 ml α -naphthylamine.

Pada tanaman *Bacillus circulans* dapat menghasilkan kitinase (Suryadi, 2014: 881). Selain itu *Bacillus circulans* memiliki sifat sebagai *plant growth promoting P-solubilization*, *auxin*, aktivitas deaminasi *1-aminocyclopropane-1-carboxylate*, *siderophore*, aktivitas *nitrogenase*, dan memiliki aktivitas antagonis terhadap agen *Dematophora necatrix* (Mehta *et al.*, 2014: 1). *Siderophore* merupakan pembawa ion besi, *siderophore* akan muncul pada saat kondisi lingkungan dengan ion Fe^{3+} terbatas dan mengakibatkan besi tidak tersedia bagi patogen (Handini, 2011: 10).

d. Bakteri Endofit SK17 (Genus Listeria)

Klasifikasi genus Listeria

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Listeriaceae
Genus	: Listeria
Species	: <i>Listeria</i> sp. (itis.gov, 2016)

Isolat bakteri SK17 diduga tergolong genus Listeria. Bakteri ini ditemukan pada jaringan akar kopi dan termasuk ke dalam bakteri endofit, hal ini sesuai dengan pendapat OIE (2008: 1239) bahwa genus Listeria dapat ditemukan pada tanah, air,

tumbuhan dan kotoran. Hal ini diperkuat lagi dengan penelitian Damayanti (2010: 19) yang menemukan bakteri endofit *Listeria murrayi* pada batang tanaman tomat.

Pada pengamatan morfologi mikroskopis bakteri ini berbentuk basil dengan ukuran panjang 1,105 – 2 µm dan diameter 330 – 311,1 nm. Hal ini didukung oleh Holt, *et al.* (1994: 566) bahwa genus *Listeria* berbentuk basil dengan ukuran panjang 0,5 – 2 µm dan diameter 400 – 500 nm. Sedangkan berdasarkan pengamatan morfologi koloni pada medium lempeng, bakteri ini tumbuh diatas permukaan medium, permukaan koloni kasar, memiliki bentuk koloni *irreguler*, elevasi *convex*, tepi *undulate* dan struktur dalam *opaque*. Bentuk koloni bakteri pada medium miring adalah *beaded*. Bentuk koloni bakteri pada medium tegak adalah *echinulate*. Bakteri ini tumbuh pada medium cair dengan pertumbuhan pada permukaan tidak membentuk cincin, tidak memperlihatkan kekeruhan, tidak berbau, endapan seperti pasir.

Pada pengamatan fisiologi bakteri ini memiliki kesamaan dengan teori yang dimiliki Holt, *et al.* (1994: 566) dan Ariyanti (2010: 94-95), yaitu bersifat gram positif, tidak tahan terhadap asam, tidak memiliki spora, dan bersifat motil. Bakteri ini bersifat anaerobik. Sedangkan pada pengamatan biokimia, bakteri ini memiliki sifat katalase positif (bakteri ini menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen), dapat memfermentasi glukosa, dan memiliki sifat fermentasi pada uji oksidasi-fermentasi (fermentasi ini terjadi pada bakteri anaerob yang dapat menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup maupun tidak). Hal ini sesuai dengan pendapat Cowan dan Steel (1970: 50).

Genus *Listeria* memiliki 6 spesies, salah satu spesiesnya yaitu *Listeria monocytogenes* diketahui umumnya hidup di tanah sebagai saprofit tetapi apabila mengkontaminasi makanan atau minuman yang dikonsumsi oleh hewan atau manusia dapat berubah menjadi patogen (Ariyanti, 2010: 95), sedangkan spesies lainnya tidak diketahui bersifat patogen yaitu *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, dan *Listeria grayi* (USFDA/BAM, 2003). Menurut

Balitjestro (2015) *Listeria monocytogenes* tidak termasuk dalam “indeks inang” yang menyerang tanaman ataupun buah pada tanaman, apabila bakteri ini ditemukan pada buah, maka buah tersebut hanya digunakan sebagai pembawa (*carrier*) bagi bakteri tersebut tanpa bisa menyerang buah atau tanaman tersebut.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- a. Pada lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis* ditemukan 6 isolat bakteri endofit yaitu 5 dari genus *Bacillus* (*Bacillus* sp. SK1, *Bacillus* sp. SK8, *Bacillus* sp. SK10, *Bacillus* sp. SK15, dan *Bacillus circulans* SK13), dan 1 dari genus *Listeria* (*Listeria* sp. SK17).
- b. Bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari lahan kopi arabika yang terserang nematoda *Radopholus similis* memiliki karakter sebagai berikut:
 - 1) Bakteri endofit SK1 berbentuk *circular* pada medium lempeng, berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 311,1 – 330 nm, tidak tahan asam, memiliki spora, motil, tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C, bersifat aerob fakultatif, bersifat positif pada uji katalase, glukosa, manitol dan gelatin, sedangkan pada uji O-F, pati, indol, V-P, nitrat, dan urea bersifat negatif.
 - 2) Bakteri endofit SK8 berbentuk *circular* pada medium lempeng, berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,100 – 3,889 μm dan diameter 695,7 – 837,7 nm, tidak tahan asam, memiliki spora, motil, tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C, bersifat anaerob, bersifat positif pada uji katalase, glukosa, manitol dan gelatin, sedangkan pada uji O-F, pati, indol, V-P, nitrat, dan urea bersifat negatif.
 - 3) Bakteri endofit SK10 berbentuk *circular* pada medium lempeng, berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,650 – 6,618 μm dan diameter 550 – 777,8 nm, tidak tahan asam, memiliki spora, motil, tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C, bersifat aerob fakultatif, bersifat positif pada uji katalase,

glukosa, manitol, gelatin, pati, dan nitrat, sedangkan pada uji O-F, indol, V-P, dan urea bersifat negatif.

- 4) Bakteri endofit SK13 berbentuk *circular* pada medium lempeng, berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,190 – 4,488 μm dan diameter 800,8 – 880 nm, tidak tahan asam, memiliki spora, motil, tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C, bersifat aerob, bersifat positif pada uji katalase, glukosa, manitol, gelatin, pati, dan nitrat, sedangkan pada uji O-F, indol, V-P, dan urea bersifat negatif.
- 5) Bakteri endofit SK15 berbentuk *circular* pada medium lempeng, berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 2,200 – 3,780 μm dan diameter 660 nm – 1,038 μm , tidak tahan asam, memiliki spora, motil, tidak dapat tumbuh pada suhu 65°C, bersifat aerob fakultatif, bersifat positif pada uji katalase, glukosa, manitol, gelatin, dan nitrat, sedangkan pada uji O-F, pati, indol, V-P, dan urea bersifat negatif.
- 6) Bakteri endofit SK17 berbentuk *irregular* pada medium lempeng, berbentuk basil, gram positif, memiliki ukuran panjang 1,105 – 2 μm dan diameter 330 – 311,1 nm, tidak tahan asam, memiliki spora, motil, bersifat anaerob, bersifat positif pada uji katalase, glukosa, sedangkan pada uji O-F bersifat fermentatif.

5.2 Saran

Disarankan bagi peneliti selanjutnya untuk:

- a. Melakukan identifikasi lebih lanjut ke pihak yang lebih berwenang.
- b. Melakukan penelitian dengan mengaplikasikan isolat bakteri endofit ini pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Aravind, R. Antony, Dinu. Eapen, Santosh J. Kumar, A dan Ramana, K.V. 2009. "Isolation and Evaluation of Endophytic Bacteria Against Plant Parasitic Nematodes Infesting Black Pepper (*Piper nigrum* L.)". *Indian Journal of Mematology*. Vol. 39(2): 211-217.
- Arios, Lisa Novita. Suryanto, Dwi. Nurtjahja, Kiki dan Munir, Erman. 2014. "Asai Kemampuan Bakteri Endofit dari Kacang Tanah dalam Menghambat Pertumbuhan *Sclerotium* sp. pada Kecambah Kacang Tanah". *J. HPT Tropika*. ISSN 1411-7525. Vol. 14(2): 178-186.
- Ariyanti, Tati. 2010. "Bakteri *Listeria monocytogenes* Sebagai Kontaminan Makanan Asal Hewan (*Foodborne Disease*)". *Wartazoa*. Vol. 20(2): 93-101.
- Asyiah, Iis Nur. Wiryadiputra, Soekadar. Fauzi, Irfan dan Harni, Rita. 2015. "Populasi *Pratylenchus coffeae* (Z.) dan Pertumbuhan Bibit Kopi Arabika Akibat Inokulasi *Pseudomonas diminuta* L. dan *Bacillus subtilis* (C.)". *Pelita Perkebunan*. Vol. 31(1): 30-40.
- Bacon, C.W. dan S., S. Hinton. 2007. Bacterial endophytes : The endophytic niche, its occupants, and its utility. Di dalam: Gnanamanickam SS. Gnanamanickam (ed.). *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Berlin. pp. 155-194.
- Bacon, C.W. dan S., S.Hinton. 2006. The use of *bacillus subtilis* as an endophyte for control of corn seedling blight disease caused by *Fusarium moniliforme*. USDA, ARS: 1 pp.
- Balitjestro. 2015. "Bakteri *Listeria monocytogenes* Tidak Menyerang Tanaman Apel di Indonesia". <http://balitjestro.litbang.pertanian.go.id/bakteri-listeria-monocytogenes-tidak-menyering-tanaman-apel-di-indonesia/>. [2 Februari 2016].
- Barrow, G.I. dan R., K. A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria Third Edition*. United Kingdom: Syndicate of the University of Cambridge.
- Benhamou, W.H. N., J.W. Kloepper, A. Quadt-Hallman. dan S., Tuzun. 1996. "Induction of Defense-Related Ultrastructural Modification in Pea Root Tissues Inoculated with Endophytic Bacteria". *Plant Physiology*. Vol. 112.

- Brooks, Freed E. 2014. *Burrowing Nematode Disease*. http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/Burrowing_nematode.aspx. [2 Februari 2016].
- Cappucino, J.G. dan Sherman, N. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. California USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. P.127-148.
- Cowan, S.T. dan Steel, K.J. 1970. *Manual For The Identification of Medical Bacteria*. London: The Syndics of The Cambridge University Press.
- Damayanti, Ika. 2010. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Endofit untuk Menekan Kejadian Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tanaman Tomat. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Dewi, Amalia Krishna. 2013. “Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap *Amoxicillin* dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta”. *Jurnal Sain Veteriner*. ISSN: 0126-0421. Vol. 31(2).
- Dropkin, V. H. 1992. *Pengantar Nematologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Dubert, K.H. dan R., A. Rohde. 1971. “Nematodes enzymes”. Dalam Zuckerman, B.M., W.F. Mai and R.A. Rohde (Eds). *Plant Parasitic Nematodes*. Vol. 2. Acad. Press. N.Y. p. 73-90.
- Elfrida, S. 2009. “Isolasi dan Uji Kemampuan Bakteri Endofit dari Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) Terhadap Fungi Perusak Makanan”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Firmansyah, R. 2012. Potensi Bakteri Endofit Dan Filoplen Asal Daun *Mucuna pruriens* Linn. Dalam Memacu Pertumbuhan Tanaman Dan Menekan Penyakit Bercak Daun *Cercospora* sp. Pada Tanaman Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L Mer). Bandung: Fakultas Pertanian Universitas Padjajaran. <https://www.scribd.com/doc/7681332/Potensi-Bakteri-Endofit-Dan-Filoplen-Asal-Daun-Mucuna-Pruriens-Linn-Dalam-Memacu-Pertumbuhan-Tanaman-dan-Menekan-Penyakit-Bercak-Daun-Cercospora-sp-p>. [22 September 2015].

- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek, Teknik Dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka. 163 hlm.
- Hallmann, J. 2001. Plant interaction with endophytic bacteria. *Di dalam* : Jeger, M.J. and Spence, N.J., editor. *Biotic Interaction In Plant-Pathogen Associations*. CAB International.
- Hallmann, J. Quadt-Hallmann, A. Mahaffee, WF. dan Kloepper, JW. 1997. "Bacterial Endophytes In Agricultural Crops. *Can*". *J. Microbiol.* Vol. 43: 895914.
- Handini, Zhenita Vinda. 2011. Keefektifan Bakteri Endofit dan *Plant Growth Promoting Rizobacteria* dalam Menekan Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tomat. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Harni, R. Munif, A. Supramana dan I, Mustika. 2007. "Potensi bakteri endofit pengendali nematoda peluka akar *Pratylenchus brachyurus* pada tanaman nilam". *Hayati*. Vol. 14: 8-12.
- Harni, R. Supramana, M.S. Sinaga, Giyanto dan Supriadi. 2010. "Pengaruh filtrat bakteri endofit terhadap mortalitas, penetasan telur dan populasi nematoda peluka akar *Pratylenchus brachyurus* pada nilam". *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. Vol. 16: 43-47.
- Harni, R. Supramana, M.S. Sinaga, Giyanto dan Supriadi. 2011. "Keefektifan bakteri endofit untuk mengendalikan nematoda *Pratylenchus brachyurus* pada tanaman nilam". *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. Vol. 17: 6-10.
- Hidayah, Nurul dan Yulianti, Titiek. 2008. "Peranan Bakteri Endofit Dalam Reaksi Ketahanan Tanaman Terhadap Patogen". *Jurnal Pengendalian Hayati*. ISSN: 1979-2190. Vol. 1(2).
- Holt, *et al.* 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. USA: Williams and Wilkins Baltimore.
- Hulupi, Retno dan Mulyadi. 2007. Sebaran Populasi Nematoda *Radopholus similis* dan *Pratylenchus coffeae* Pada Lahan Perkebunan Kopi. *Pelita Perkebunan*. 23(3). 176-182.

- Iftita, Wahyu Dewi. Shovitri, Maya dan Zulaika, Enny. 2014. "Pengaruh HgCl₂ terhadap Viabilitas *Bacillus* S1 dan Potensi Enzim Pendegradasi Senyawa Organik". *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. Vol. 3(1). 2337-3520.
- Imawati, Rohana. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhizza*) Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Terhadap Bakteri *Pseodomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Indarti, S. 2008. *Biopeptisida Berbahan Aktif Mikroba Kitinolitik untuk Pengendalian Nematoda Parasit (Pratylenchus coffeae) pada Tanaman Kopi*. <http://lib.ugm.ac.id>. [28 Oktober 2015].
- Izza, Iffa. 2011. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Tanaman Mahkota Dewa (*Phaleria macrocorpa*) yang Berpotensi Sebagai Penghasil Antimikroba. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga.
- Jawetz, Ernest. Melnick, Joseph L. dan Adelberg, Edward A.. 1996. *Mikrobiologi Klinik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Jutono. Soedarsono, Joedoro. Hartadi, Sri. S., Siti Kabirun. D., Suhadi dan Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum (Untuk Perguruan Tinggi)*. Yogyakarta: Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.
- Juwita. 2010. *Potensi Bakteri Endofit Dalam Meningkatkan Ketahanan Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum*) Terhadap Serangan Nematoda Sista Kuning (*Globoderma rostochinensis*)*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kristiana. 2011. *Populasi Bakteri Endofit Pada Pertanaman Lada (*Piper nigrum* L.) Di Provinsi Bangka Belitung Dan Potensinya Sebagai Agensia Hayati*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Laban, Edwin Pranata. 2012. Perbandingan Efek Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Tingkat Kewaspadaan dan Ketelitian pada Perempuan Dewasa. <http://repository.maranatha.edu/2693/1/0910160> Abstract TOC.pdf. [2 Februari 2016]

- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta: 168 hlm.
- Madigan, Michael T., Martinko, John M., dan Parker, Jack. *Brock Biology of Microorganisms Eighth Edition*. USA: Prentice-Hall, Inc.
- Makete, T. Hallmann, J. Sebastian, K. dan Sikora, R.A. 2009. "Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*". *Nematology*. Vol. 11(1): 117-127.
- Marlina. 2008. "Identifikasi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan Metode Biologi dan Deteksi Gen *ToxR* nya Secara PCR". *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Vol. 13(1): 11-17.
- Mehta, Preeti. Walia, Abhishek. Kulshrestha, Saurabh. Chauhan, Anjali dan Shikot, Chand Karan. 2014. "Efficiency of Plant Growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for Enhancement of Tomato Growth Under Net House Conditions". *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 53: 1-12.
- Melliawati, Ruth. 2015. *Potensi Mikroba Endofit*. <http://www.biotek.lipi.go.id/index.php/publication/berita/biotek/1448-potensi-mikroba-endofit>. [30 November 2015].
- Mukidi. 2012. *Hitung Buah Kopi Arabika*. <https://mukidi.wordpress.com/page/8/?app-download=ios>. [1 September 2015].
- Munif, Abdul dan Hipi, Awaludin. 2011. Potensi Bakteri Endofit dan Rhizosfer dalam Meningkatkan Pertumbuhan Jagung. Tidak Diterbitkan. Seminar National Serealia. Bogor: IPB.
- Munif, Abdul. Herliyana, Elis Nina. Sukarno, Bonny Poernomo Wahyu. 2013. *Isolasi Dan Seleksi Bakteri Endofit Dari Tanaman Kehutanan Sebagai Agens Hayati Nematoda Parasit Tumbuhan*. http://web.ipb.ac.id/~lppm/lppmipb/penelitian/hasilcari.php?status=buka&id_haslit=DASAR/030.13/MUN/i. [30 September 2015].
- Munif, Abdul. Wiyono, Suryo dan Suwarno. 2012. "Isolasi Bakteri Endofit Asal Padi Gogo dan Potensinya sebagai Agens Biokontrol dan Pemacu Pertumbuhan". *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. Vol. 8(3): 57-64.

- Mustika, I. dan Y, Nuryani. 2003. Penyakit – Penyakit Utama Tanaman Yang Disebabkan Oleh Nematoda. dalam. Bahan Pelatihan. Identifikasi dan Pengelolaan Nematoda Parasit Utama Tumbuhan. 26 – 29 Agustus 2003. Bogor. *Dalam: Nematoda Parasit Tanaman*, ISBN 978 - 979 - 3100 - 96 - 8.
- Mustika, I. dan Y, Nuryani. 2006. “Strategi Pengendalian Nematoda Prasiit Pada Tanaman Nilam”. *Jurnal Litbang Pertanian*. Vol. 25(1).
- Mustika, I., 1990. Studies on the interaction of *Meloidogyne incognita*, *Radopholus similis* and *Fusarium solani* on black pepper (*Piper nigrum* L.). Wageningen Agric. Univ. The Netherlands. 127 pp.
- Najiyati, S. dan Danarti. 2007. *Kopi Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Nugroho, T.T., Ali, M., Ginting, C., dan Wahyuningsih. 2003. “Isolasi dan Karakterisasi Sebagian Kitinase *Trichoderma viride* TNJ63”. *Jurnal Natur Indonesia*. Vol. 5(2): 101-106.
- Nursulistyarini, Fenni. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari Daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Tidak Diterbitkan. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga.
- OIE Terrestrial Manual. 2008. Chapter 2.9.7 *Listeria monocytogenes*. pp 1238-1254. [http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.09.07 LISTERIA MONO.pdf](http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf).
- Panggabean, Edy. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro Media Pustaka.
- Pastra, Defin Ari. Melki dan Surbakti, Heron. 2012. “Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina* sp sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung”. *Maspari Journal*. Vol. 4(1): 77-82.
- Pelczar, M.J. dan E., C.S. Chan. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Jilid 1. Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka, penerjemah. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia. Hal.81-91.
- Pelzar, M.J dan E., C.S Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta : UI Press.

- Puspitasari, Fajar Diah, Shovitri, Maya, dan Kuswytasari, Nengah Dwianita. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. ISSN: 2301-928X. Vol. 1(1).
- Pranoto, Eko, Fauzi, Gilang dan Hingdri. 2014. “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Pada Tanaman Teh (*Camellina sinensis* (L.) O. Kuntze) Produktif dan Belum Menghasilkan Klon GMB 7 Dataran Tinggi”. *Biospecies*. Vol. 7(1): 1-7.
- Prasetyoputri, A. dan Atmosukarto, Ines. 2006. “Mikroba Endofit Sumber Acuan Baru yang Berpotensi”. *Biotrend*. Vol. 1(2).
- Putra, H. 2007. Aktivitas Anti Bakteri Metabolit Jamur Endofit dari *Alyxia reinwardtii* BI. Dengan Metode Bioautografi. <http://www.lemlit.undip.ac.id>. [28 Oktober 2015].
- Radji, Maksum. 2005. “Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal”. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. ISSN: 1693-9883. Vol. 11(3): 113-126.
- Rahardjo, Pudji. 2012. *Kopi: Panduan Budi Daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahman, Taufik. tanpa tahun. *Nutrisi dan Energi Tumbuhan*. Jakarta: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Resti, Zurai, Habazar, Trimurti, Putra, Deddi Prima, dan Nasrum. 2013. “Skrining Dan Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Untuk Mengendalikan Penyakit Daun Bakteri Pada Bawang Merah”. *J. HPT Tropika*. ISSN: 1411-7525. Vol. 13(2): 167 – 178.
- Sari, Ramdana dan Prayudyaningsih, Retno. 2015. “*Rhizobium* Pemanfaatannya sebagai Bakteri Penambat Nitrogen”. *Info Teknis EBONI*. Vol. 12 (1): 51-64.
- Sastrahidayat, I.R. 1992. *Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Surabaya: Usaha Nasional.
- Saylendra, Andree dan Firnia, Dewi. 2013. “*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. Asal Endofit Akar Jagung (*Zea mays* L.) yang Berpotensi Sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman”. *Jurnal Ilmu Pertanian dan Perikanan*. ISSN 2302-6308. Vol. 2 (1): 19-27.

- Schulz, B. J. E. Boyle, C. J. C. dan Sieber, T. N. 2006. *Microbial Root Endophytes*. Jerman: Springer.
- Sekora, Nicholas. 2012. *Radopholus similis* (Cobb, 1893). http://entnemdept.ufl.edu/creatures/NEMATODE/Radopholus_similis.htm. [1 September 2015].
- Semangun, Haryono. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Setiawati, W. Uhan, T. S., dan Udiarto, B. K. 2004. “Pemanfaatan Musuh Alami dalam Pengendalian Hayati Hama pada Tanaman Sayuran. Balai Penelitian Tanaman Sayuran”. *Monografi No. 24*.
- Siddiqi, Mohammed R. 2012. *Radopholus similis* (Cobb, 1893). http://entnemdept.ufl.edu/creatures/NEMATODE/Radopholus_similis.htm. [1 September 2015].
- Sikora, R. A., K. Schafer dan A., A. Dababat. 2007. “Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant parasitic nematodes”. *Australasian Plant Pathology*. Vol. 36: 124-134.
- Simarmata, R. Lekatompessy.,S. dan Sukiman, H. 2007. “Isolasi Mikroba Endofitik Dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens*) Dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba”. *Berk Penel Hayati*. Vol. 13: 85-90.
- Soedibyo, B.R.A., 1998. *Alam Sumber Kesehatan*. Jakarta: Balai Pustaka.
- Strobel, Gary dan Bryn, Daisy. 2003. “Bioprospecting for Microbia Endophytes and Their Natural Products”. *Microbiologi and Molecular Biology Reviews*. Vol. 67(4).
- Supramana, Supriadi dan Harni, R. 2007. Seleksi dan karakterisasi bakteri endofit untuk mengendalikan nematoda *Pratylenchus brachyurus* pada tanaman nilam. Laporan Hasil Penelitian Institut Pertanian Bogor dengan Litbang Pertanian Proyek KKP3T. 28 hlm.
- Supramana, Supriadi dan Harni, R. 2008. Seleksi dan karakterisasi bakteri endofit untuk mengendalikan nematoda peluka akar (*Pratylenchus brachyurus*) pada tanaman nilam. Laporan Hasil Penelitian. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Suriawiria, U. 1985. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Bandung: Angkasa.
- Suryadi, Yadi. Priyantno, TP. Samudra, IM. Susilowati, DN. dan Sutoro, Puji Lestari. 2014. “Seleksi Bakteri Endofit Penghasil Kitinase Sebagai Agen Biokontrol Fungi Patogen *Rhizoctonia Solani* dan *Pyricularia oryzae* pada Tanaman Padi”. Seminar nasional BKS PTN Barat.
- Thakuria, D. Talukdar, N.C. Goswami, C. Hazarika dan Boro, R.C. 2004. “Characterization and Screening of Bacteria from Rhizosphere of Rice Grown in Acidic Soils of Assam”. *Current Science*. Vol. 86.
- Tian, B.. J., Yang K. dan Zhang. 2007. “Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects”. *FEMS Microbiol Ecol*. Vol. 61 : 197-213.
- Todar, K. 2002. *Staphylococcus* Bacteriology at UW-Bacteriology. 330 Home Page 1-7.
- Tomita, F. 2003. “Endophytes in Southeast Asian and Japan : their taxonomic diversity and potential applications”. *Fungal Diversity*. Vol. 14: 187-204.
- Widjajanti, H. Munawar. 1996. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. FMIPA-Biologi Universitas Sriwijaya. Inderalaya: 38 hlm.
- Williams, T. D. dan J. Bridge. 1983 *Plant Pathologist’s Pocketbook* Second Edition. Commonwealth Agriculture Bureaux. The Canbrian News Ltd, Queen Street, Aberystwyth, wales.
- Wiryadiputra, Anggraini, Waluyo, dan Pujiastuti. 2010. “Pengaruh Ekstrak Biji Sirsak (*Anona muricata*) Terhadap Perkembangan Nematoda *Pratylenchus coffeae* Pada Tanaman Kopi Arabika”. *Jurnal Pelita Perkebunan*. Vol. 26(3): 156-168.
- Yulvizar, Cut. 2013. “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger* sp.”. *Biospecies*. Vol. 6(2): 1-7.
- Zhao, Z.Q. dan Crosby, T.K. 2011. *Burrowing Nematode (Radopholus similis)*. <http://www.padil.gov.au>. [28 Oktober 2015].

MATRIKS PENELITIAN

Judul	Latar Belakang	Rumusan Masalah	Metodologi Penelitian
<p>Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda <i>Radopholus similis</i></p>	<p>Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tanaman (Melliawati, 2015; Juwita, 2010: 5; Hidayah dan Yulianti, 2008: 88) dan dapat membentuk koloni tanpa menimbulkan kerusakan pada tanaman tersebut (Strobel dan Bryn, 2003). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari perakaran nilam dapat menekan populasi <i>P. brachyurus</i> 73,9% pada tanaman nilam di rumah kaca (Harni <i>et al.</i>, 2007) dan filtratnya dapat membunuh <i>P. brachyurus</i> sebesar 91-100% <i>in vitro</i> (Harni <i>et al.</i>, 2010), serta dari hasil penelitian Makete <i>et al.</i> (2009: 121) menunjukkan ada 14 bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari tanaman kopi Ethiopia yang dapat menghambat pertumbuhan nematoda <i>M. incognita</i>.</p> <p>Program konversi lahan kopi di Indonesia menemui beberapa kendala yaitu muncul serangan nematoda <i>Radopholus similis</i> pada konversi lahan kopi robusta ke kopi arabika yang dilakukan di lahan ketinggian menengah (700 – 900m dpl). Nematoda ini menimbulkan gejala kerusakan pada varietas kopi arabika tipe katai tahan penyakit karat daun, tanaman tumbuh meranggas dengan ranting mengering tanpa daun setelah pembuahan pertama (Hulupi dan Mulyadi, 2007: 177). Namun beberapa tanaman tidak menunjukkan gejala kerusakan.</p>	<p>a. Apa sajakah spesies /genus bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda <i>Radopholus similis</i>?</p> <p>b. Bagaimanakah karakter morfologi, biokimia, dan fisiologi dari masing-masing spesies/genus bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari lahan kopi arabika yang terserang Nematoda <i>Radopholus similis</i>?</p>	<p>Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian exploratif.</p>

	<p>Pada tanaman kopi yang tidak menunjukkan gejala kerusakan, diduga memiliki bakteri endofit yang membuat pertahanan dalam tubuh tanaman tersebut. Dari beberapa hasil penelitian, menyatakan bakteri ini mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya (Tan <i>et al.</i>, 2001 dalam Radji, 2005: 118).</p> <p>Kemampuan bakteri endofit dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder (Radji, 2005: 118). Sehingga perlu adanya penelitian mengenai spesies/genus bakteri endofit yang berasal dari lahan kopi arabika yang terserang nematoda <i>Radopholus similis</i>, maka akan dilakukan penelitian dengan judul Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda <i>Radopholus similis</i>.</p>		
--	---	--	--

LAMPIRAN B. ISOLASI BAKTERI



B1. Proses Sterilisasi Permukaan Akar



B2. Proses Pembuatan Medium

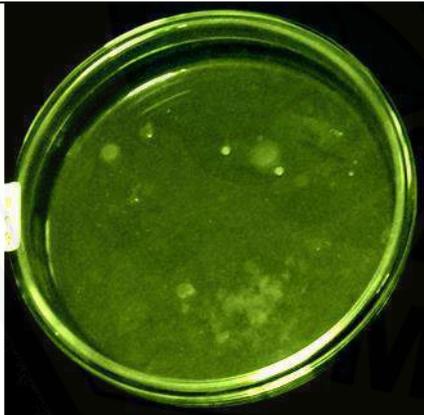


B3. Proses Isolasi Akar Kopi

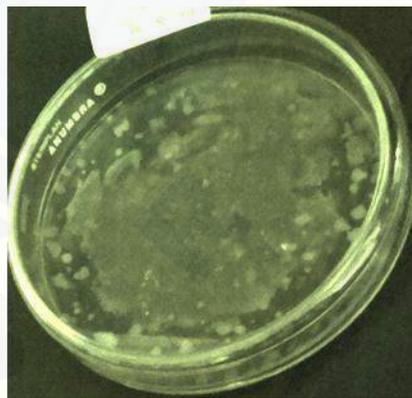


B3. Proses Peremajaan Bakteri

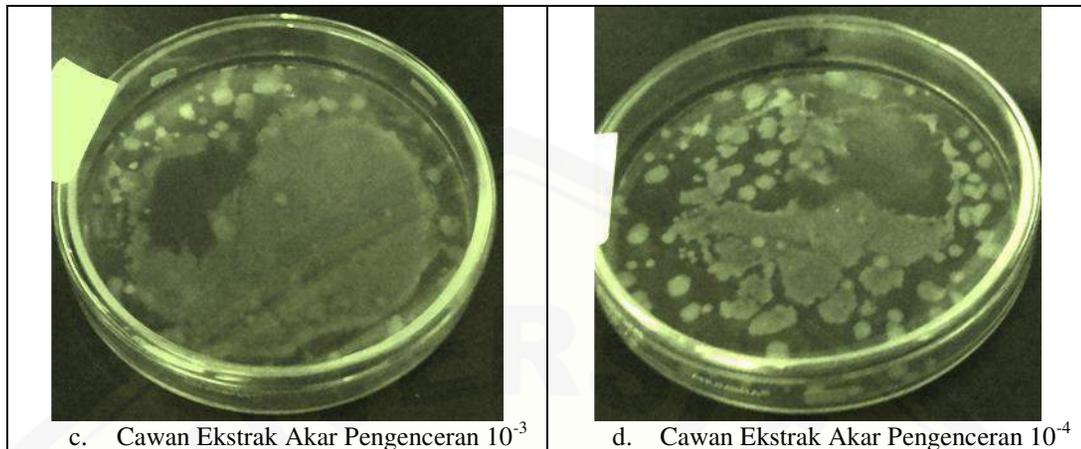
B4. Proses Isolasi Bakteri



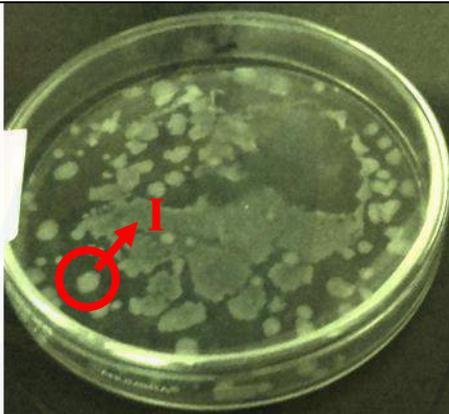
a. Cawan Kontrol (Goresan Akar)

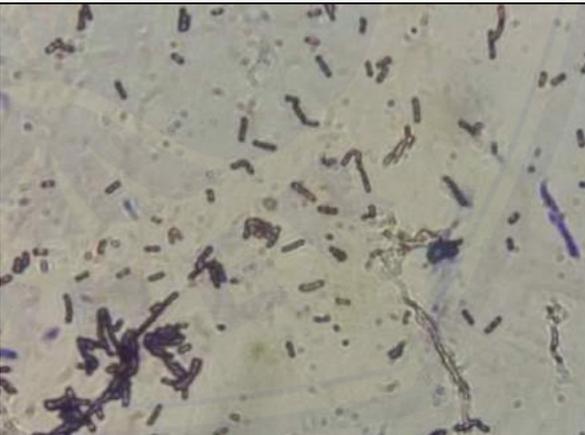


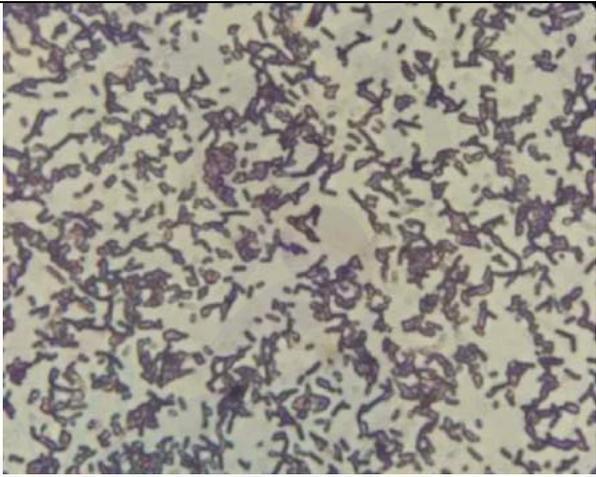
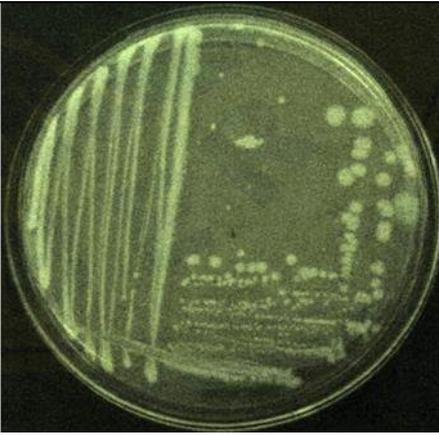
b. Cawan Ekstrak Akar Pengenceran 10^{-3}

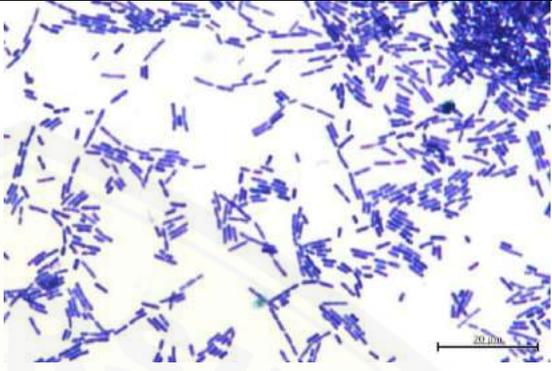
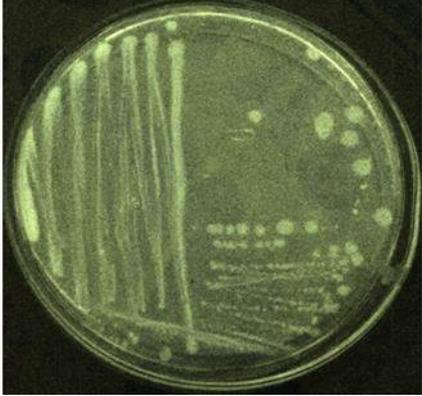
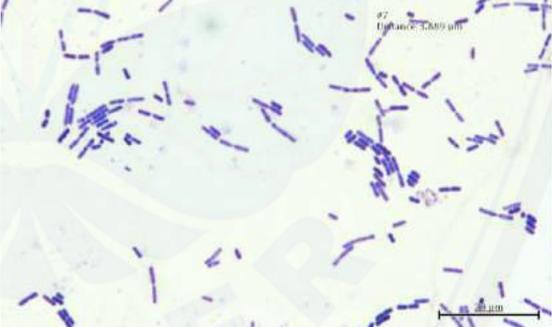


B5. Proses Purifikasi (Pemurnian) Bakteri Endofit SK8

Keterangan	Gambar
<p>1. Bakteri yang tumbuh pada cawan yang berisi gerusan akar dengan pengenceran 10^{-4}.</p> <p>“I” merupakan bakteri yang di isolasi.</p>	

<p>2. Strekan pertama pada medium TSA</p>	 A petri dish containing a TSA (Tryptic Soy Agar) medium. The surface is covered with a dense, confluent layer of bacterial growth, appearing as a uniform, slightly opaque white film. This represents the first streak.
<p>3. Strekan ke-10 pada medium TSA</p>	 A petri dish containing a TSA medium. The surface shows a confluent layer of bacterial growth, similar to the first streak, but with some visible streaking and a slightly more textured appearance, indicating the 10th streak.
<p>4. Hasil pewarnaan bakteri untuk mengetahui keseragaman bakteri</p>	 A micrograph showing a field of view of stained bacteria. The bacteria are predominantly rod-shaped and appear purple, indicating they are Gram-negative. There is a high degree of uniformity in their morphology and staining, suggesting a pure culture.

<p>5. Strekan ke-19 pada medium TSA</p>	 A petri dish containing a TSA (Tryptic Soy Agar) medium. The surface is covered with several parallel streaks of a white, opaque bacterial culture, indicating a streaked inoculation technique.
<p>6. Hasil pewarnaan bakteri yang ke-19</p>	 A microscopic view of a bacterial smear. The bacteria are stained purple, likely with Gram stain. They appear as numerous small, rod-shaped organisms scattered across the field of view.
<p>7. Strekan ke-32 pada medium TSA</p>	 A petri dish containing a TSA (Tryptic Soy Agar) medium. The surface shows several parallel streaks of a white, opaque bacterial culture, similar to the first image, indicating a streaked inoculation technique.

<p>8. Hasil pewarnaan bakteri yang ke-32</p>	 <p>A micrograph showing numerous purple-stained rod-shaped bacteria. A scale bar in the bottom right corner indicates 20 μm.</p>
<p>9. Streak terakhir pada medium TSA</p>	 <p>A photograph of a petri dish containing TSA medium. The medium is yellowish and shows several vertical streaks of bacterial growth. There are also some small, white, circular colonies scattered across the surface.</p>
<p>10. Hasil pewarnaan terakhir, bakteri menunjukkan keseragaman</p>	 <p>A micrograph showing purple-stained rod-shaped bacteria. The bacteria appear uniform in size and shape. A scale bar in the bottom right corner indicates 20 μm.</p>

LAMPIRAN C. ISOLAT BAKTERI MURNI

			
a. Isolat Bakteri Nonendofit (KA)	b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)	c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)	d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)
			
e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)	f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)	g. Isolat Bakteri Endofit (SK17)	

LAMPIRAN D. PENGAMATAN MAKROSKOPIS**D.1 Pengamatan Makroskopis pada Medium Tegak**

			
a. Isolat Bakteri Nonendofit (KA)	b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)	c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)	d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)
			
e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)	f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)	g. Isolat Bakteri Endofit (SK17)	

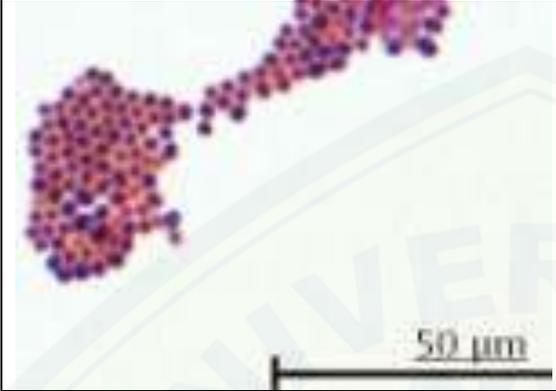
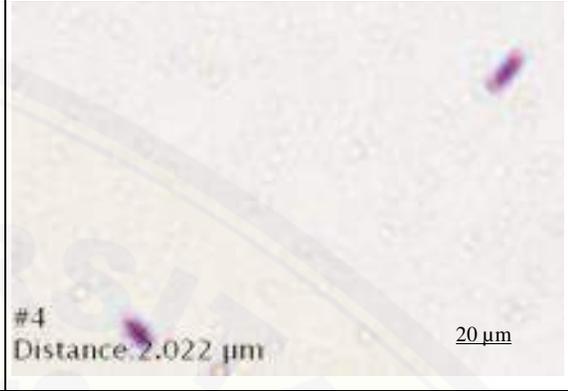
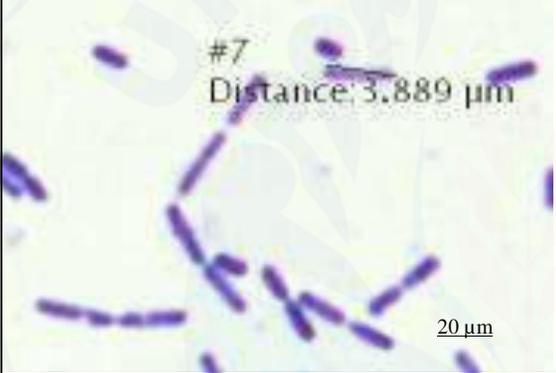
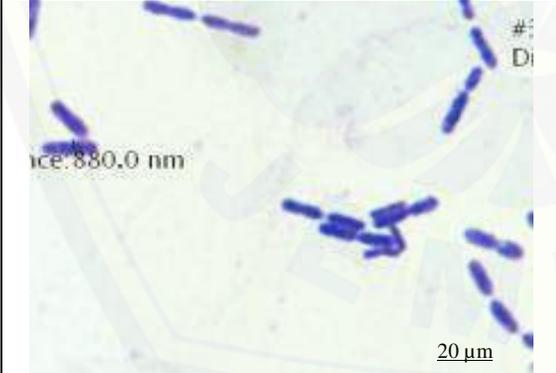
D.2 Pengamatan Makroskopis pada Medium Miring

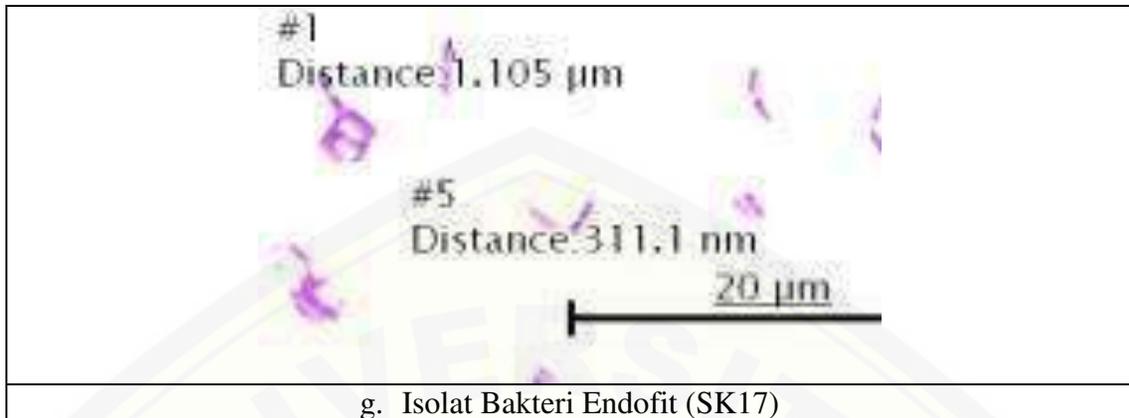
			
a. Isolat Bakteri Nonendofit (KA)	b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)	c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)	d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)
			
e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)	f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)	g. Isolat Bakteri Endofit (SK17)	

D.3 Pengamatan Makroskopis pada Medium Cair

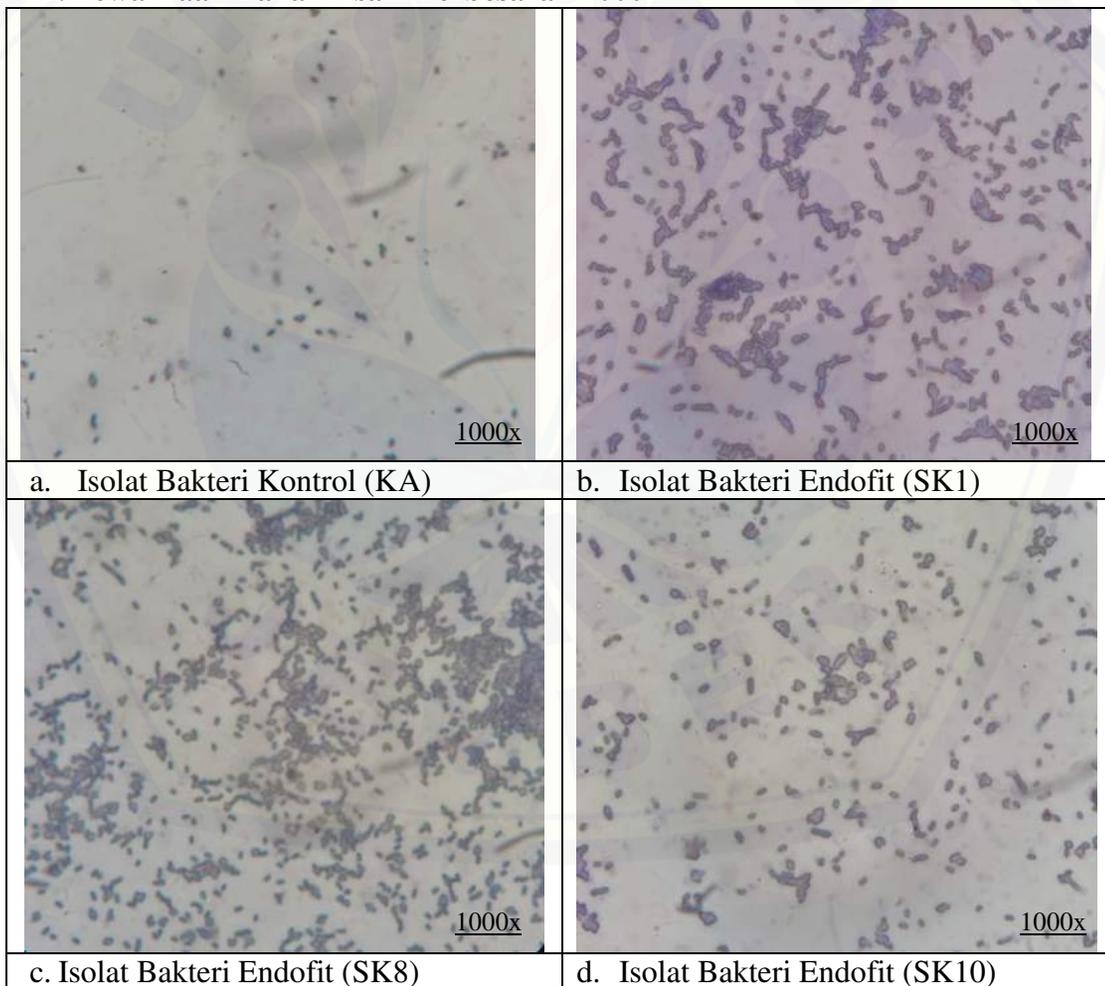
			
a. Isolat Bakteri Nonendofit (KA)	b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)	c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)	d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)
			
e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)	f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)	g. Isolat Bakteri Endofit (SK17)	

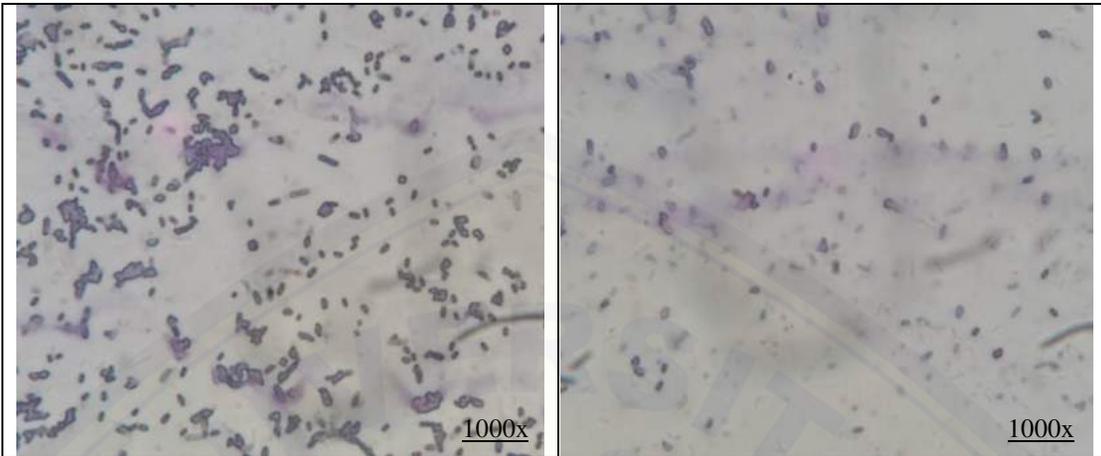
LAMPIRAN E. UJI FISILOGI
E1. Pewarnaan Gram

	
<p>a. Isolat Bakteri Kontrol (KA)</p>	<p>b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)</p>
	
<p>c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)</p>	<p>d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)</p>
	
<p>e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)</p>	<p>f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)</p>



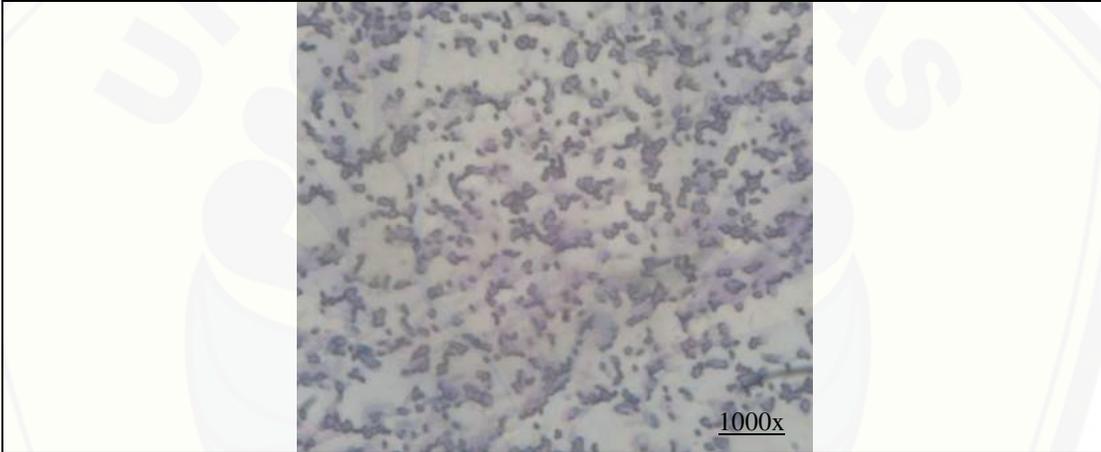
E2. Pewarnaan Tahan Asam Perbesaran 1000x





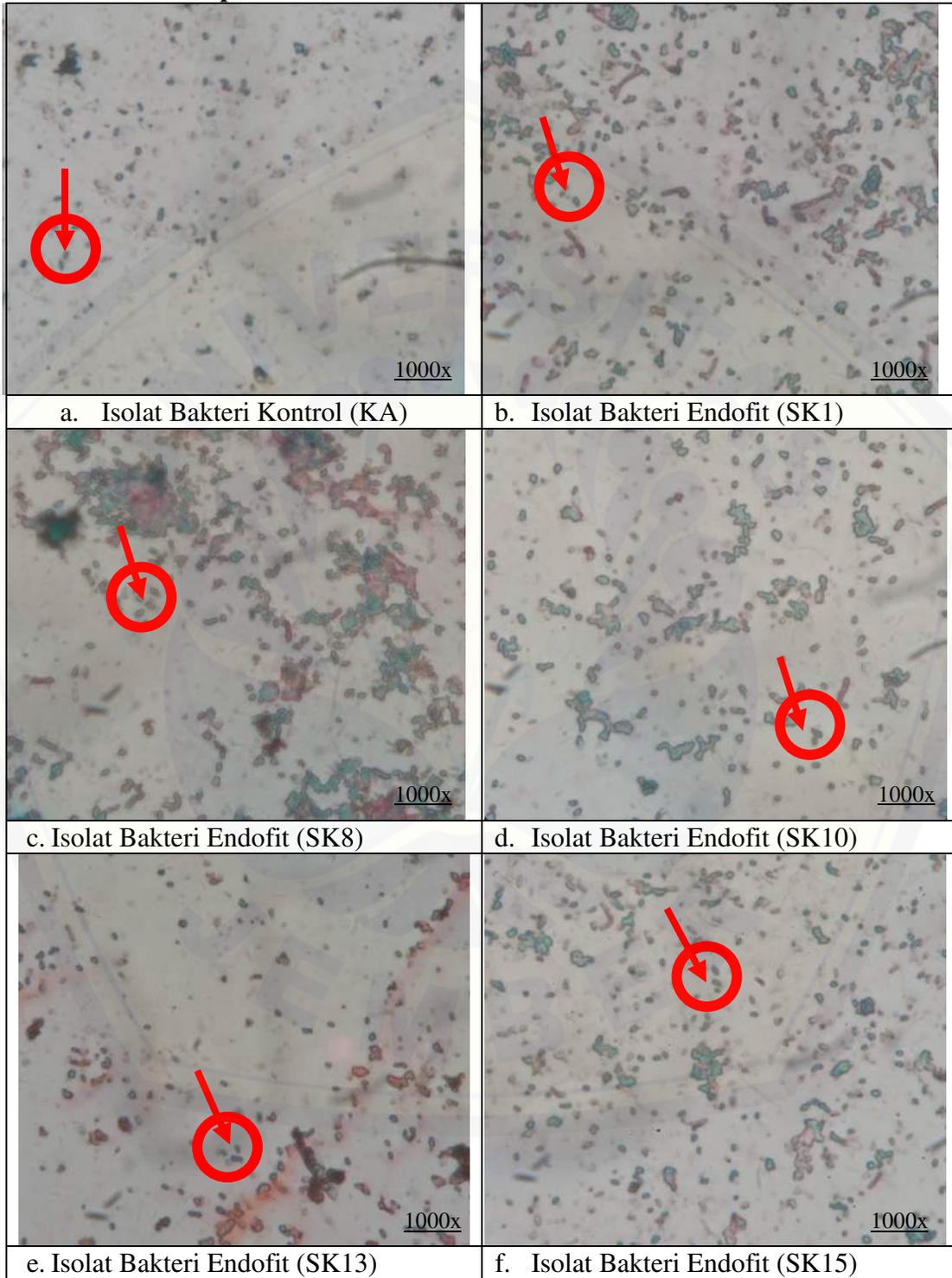
e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)

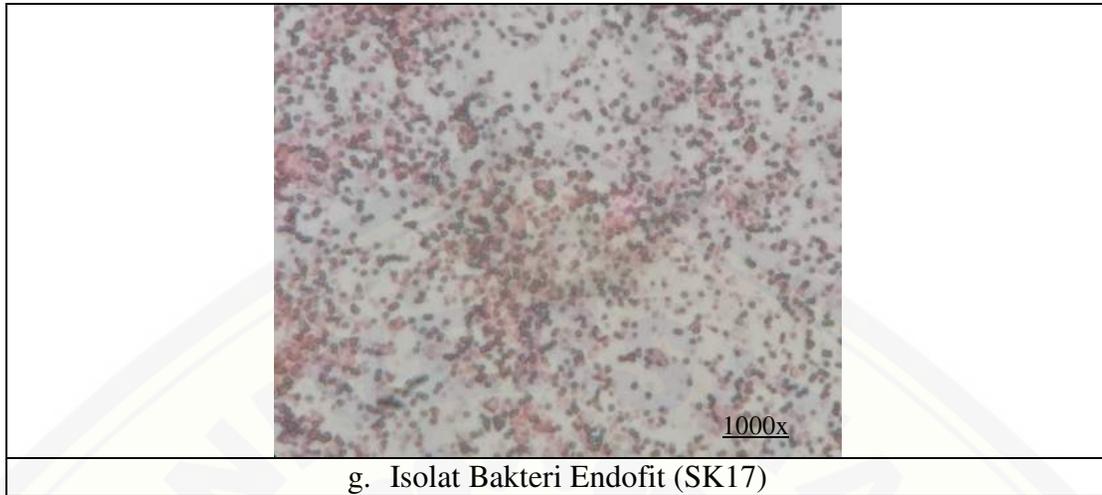
f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)



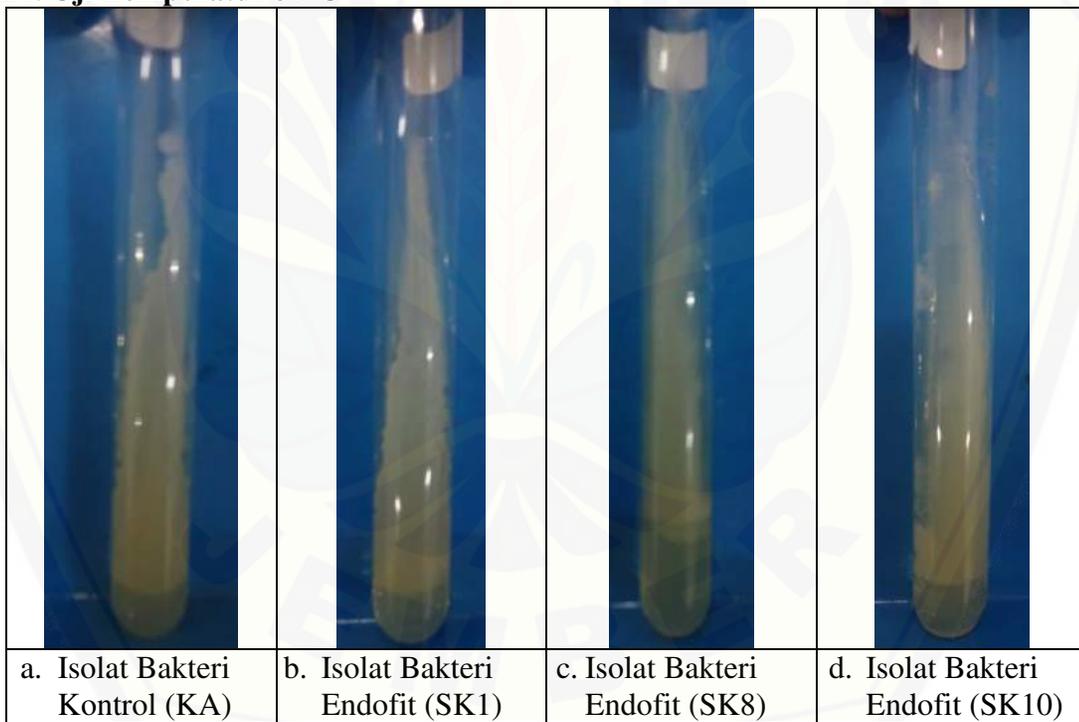
g. Isolat Bakteri Endofit (SK17)

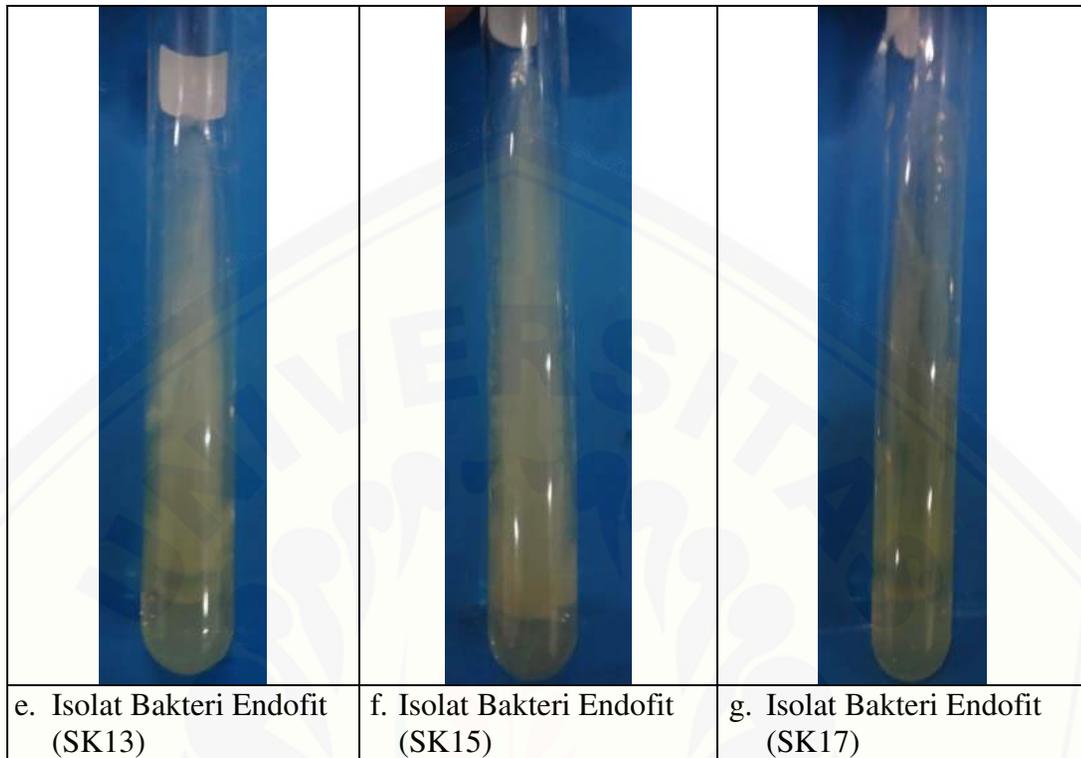
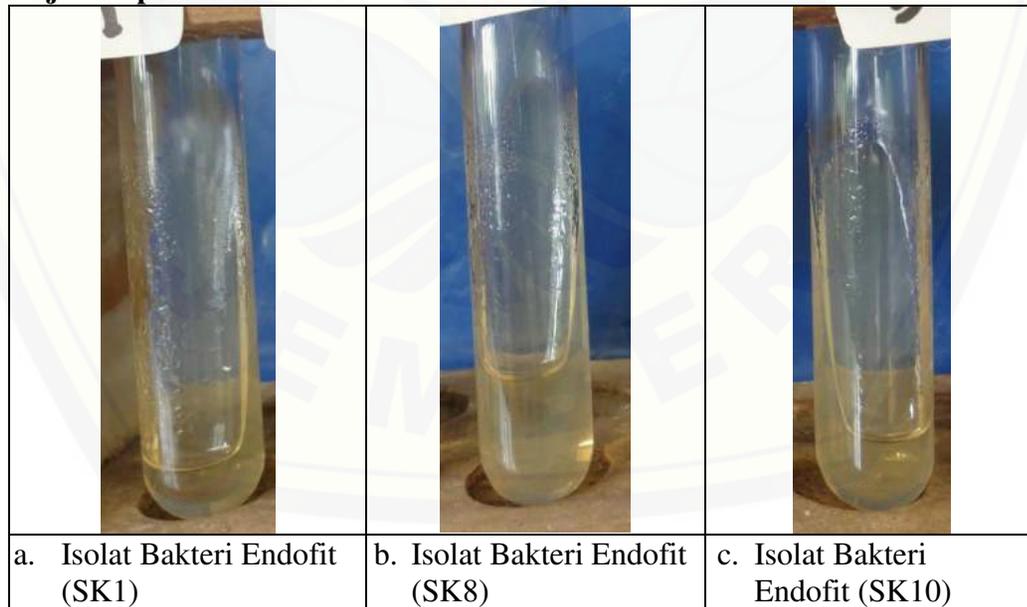
E3. Pewarnaan Spora Perbesaran 1000x

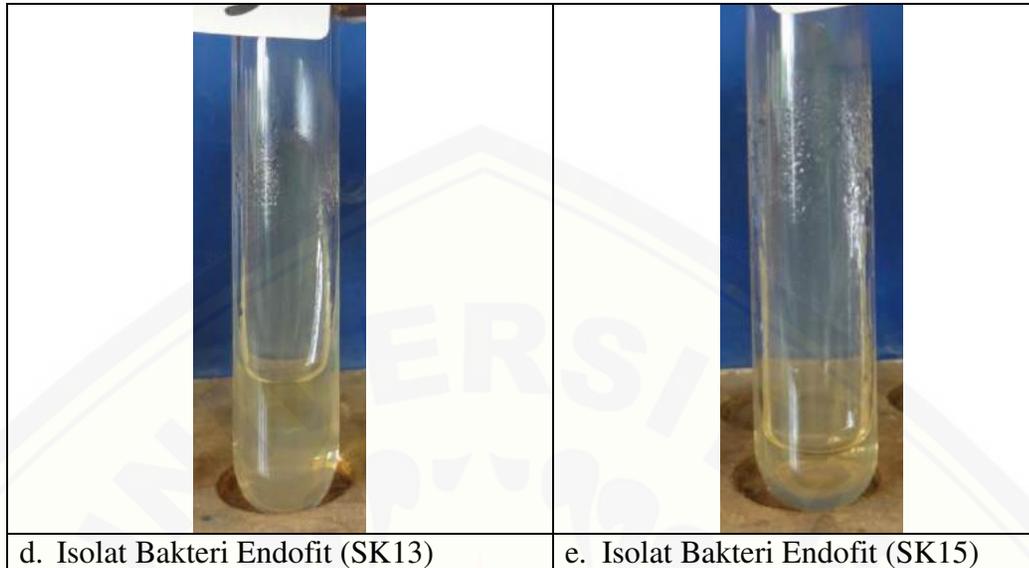




E4. Uji Temperatur 37°C

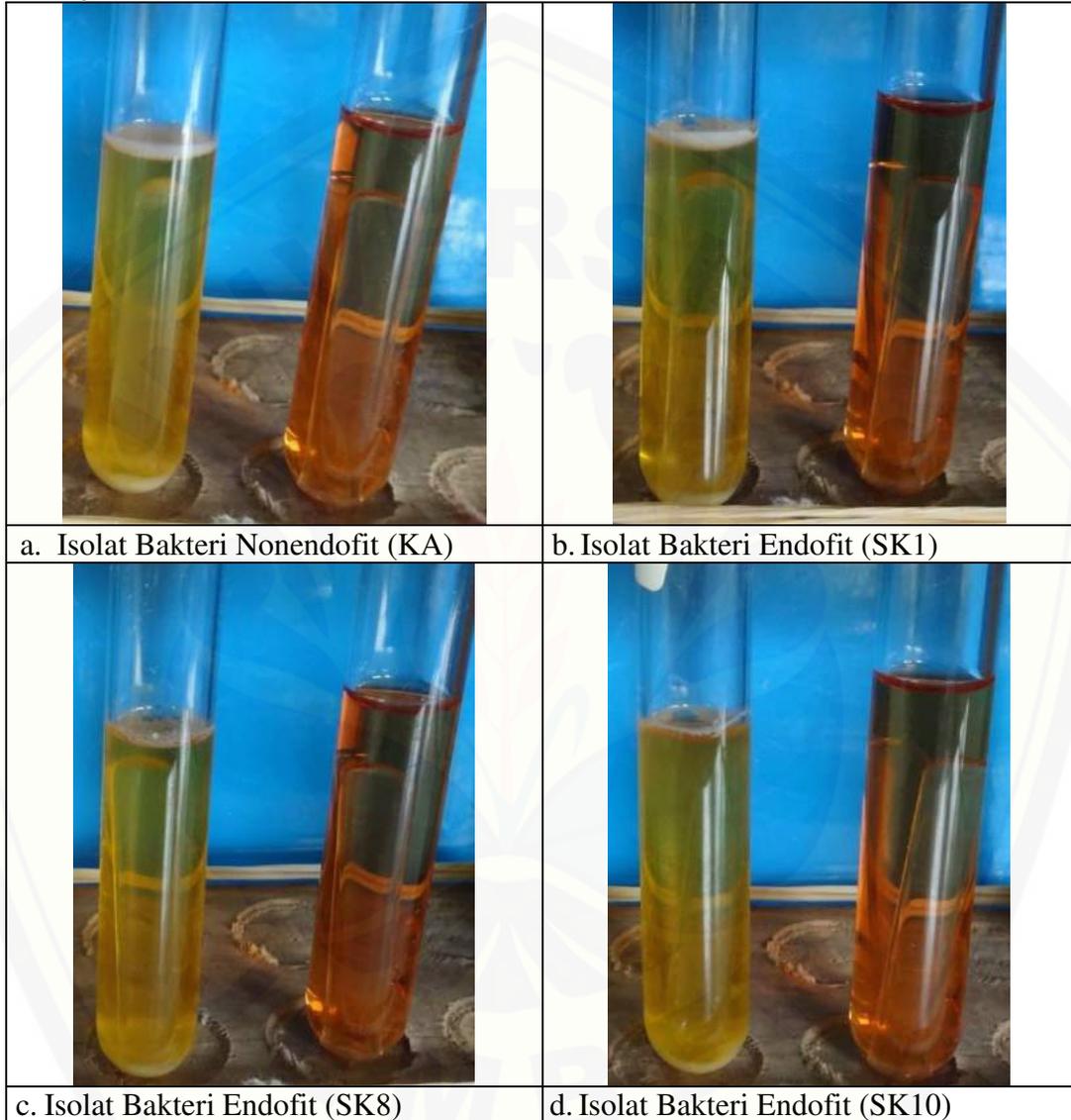


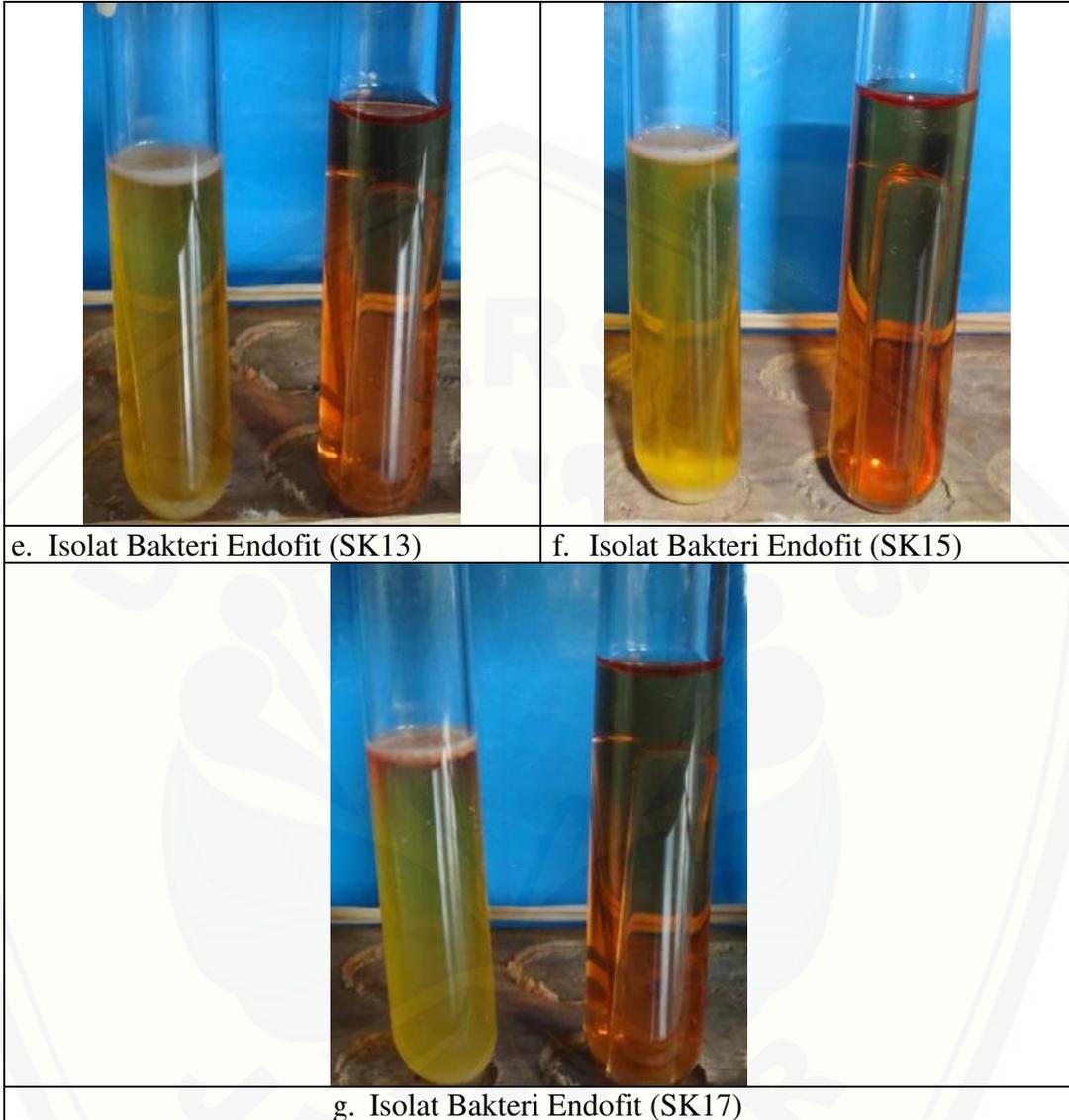
**E5. Uji Temperatur 65°C**



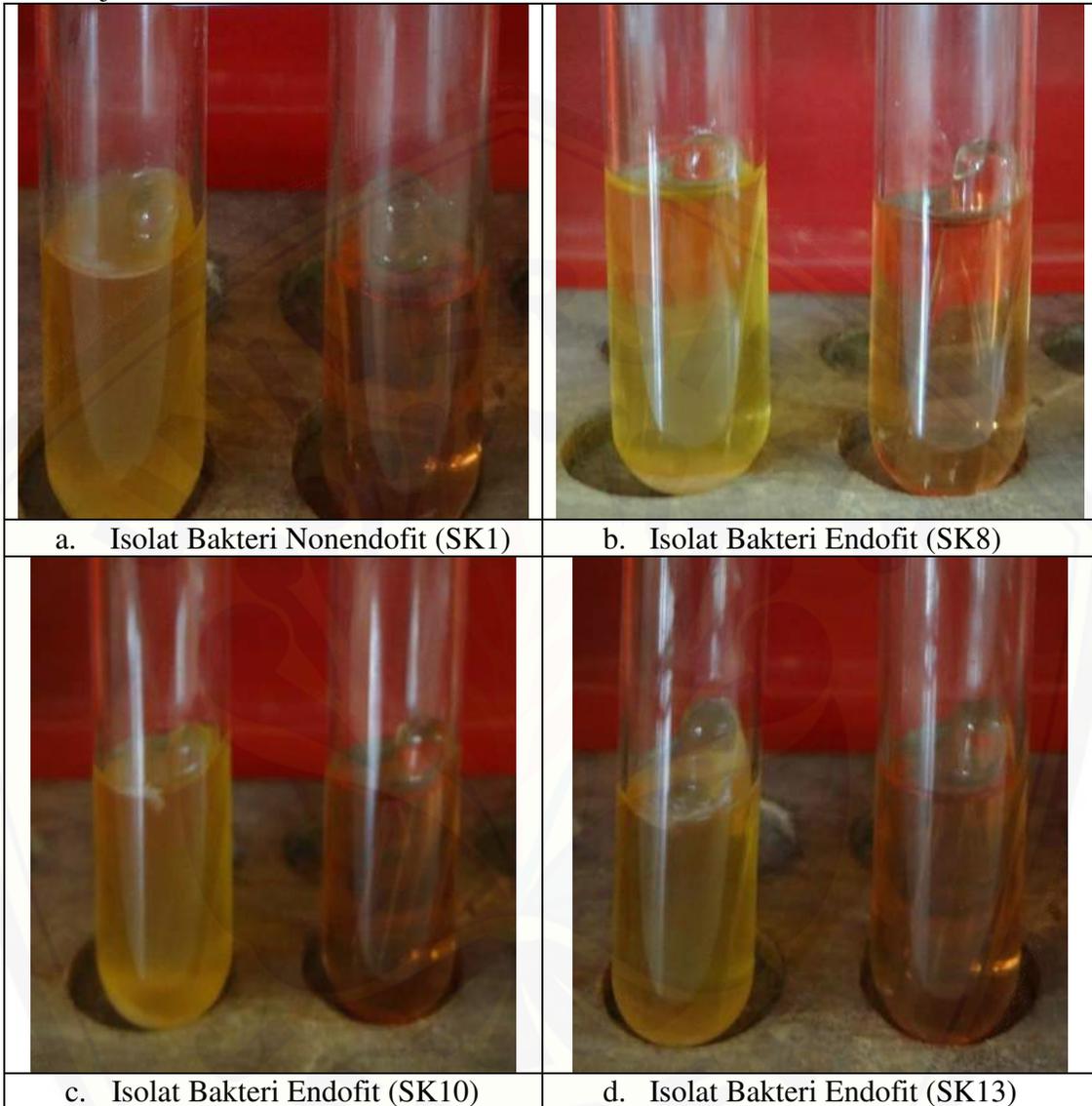
d. Isolat Bakteri Endofit (SK13)

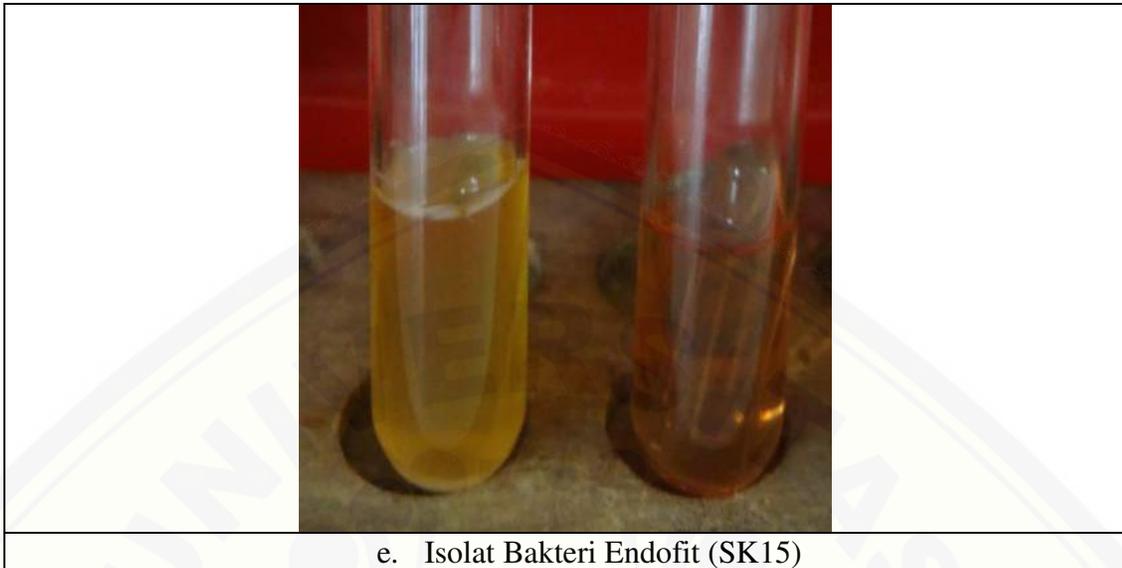
e. Isolat Bakteri Endofit (SK15)

LAMPIRAN F. UJI BIOKIMIA**F1. Uji Fermentasi Karbohidrat****F1a. Uji Glukosa**



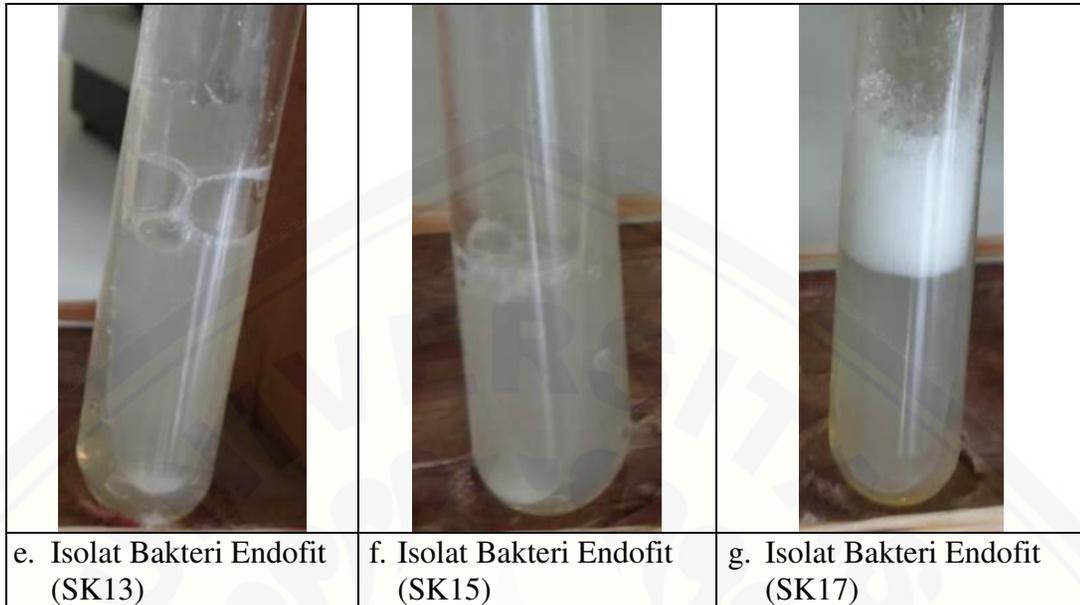
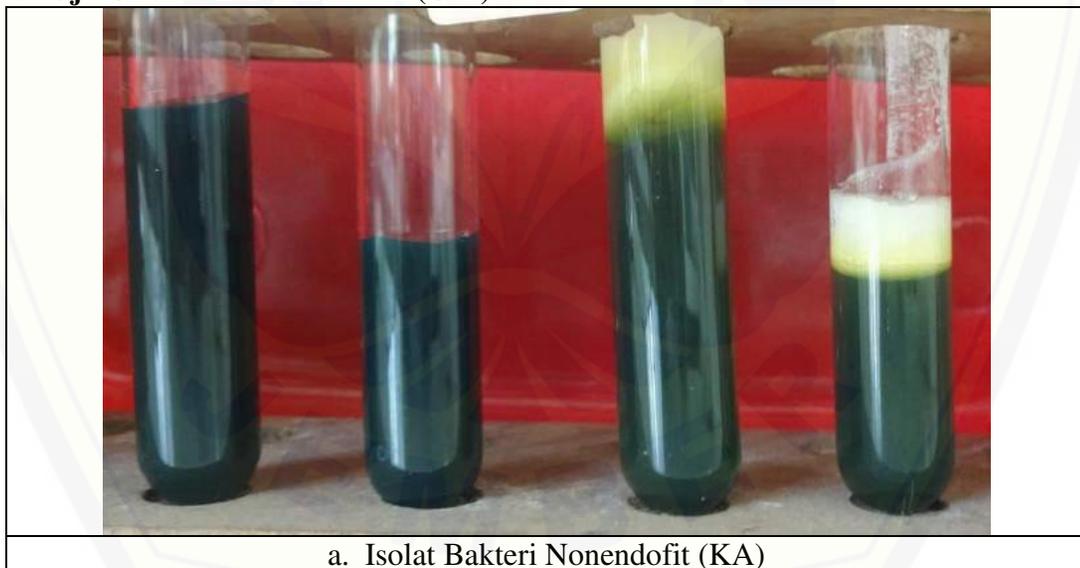
F1b. Uji Manitol





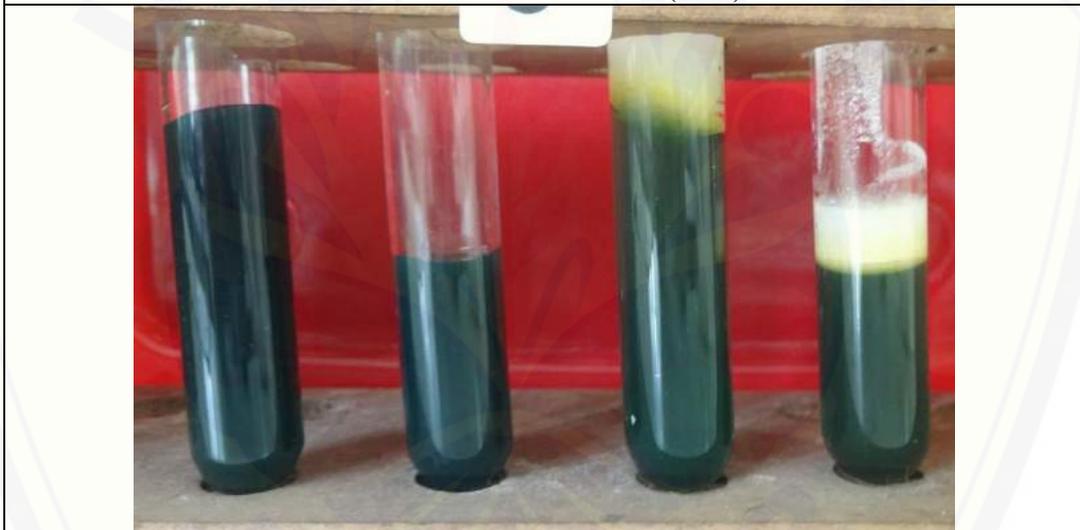
F2. Uji Katalase

<p>a. Isolat Bakteri Nonendofit (KA)</p>	<p>b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)</p>	<p>c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)</p>	<p>d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)</p>

**F3. Uji Oksidatif-Fermentatif (O-F)**



b. Isolat Bakteri Endofit (SK1)



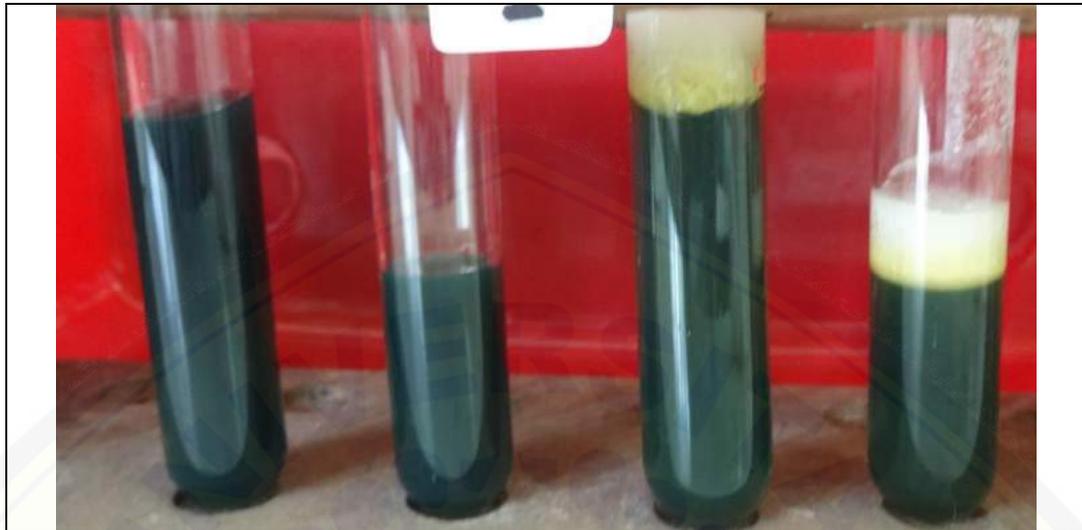
c. Isolat Bakteri Endofit (SK8)



d. Isolat Bakteri Endofit (SK10)



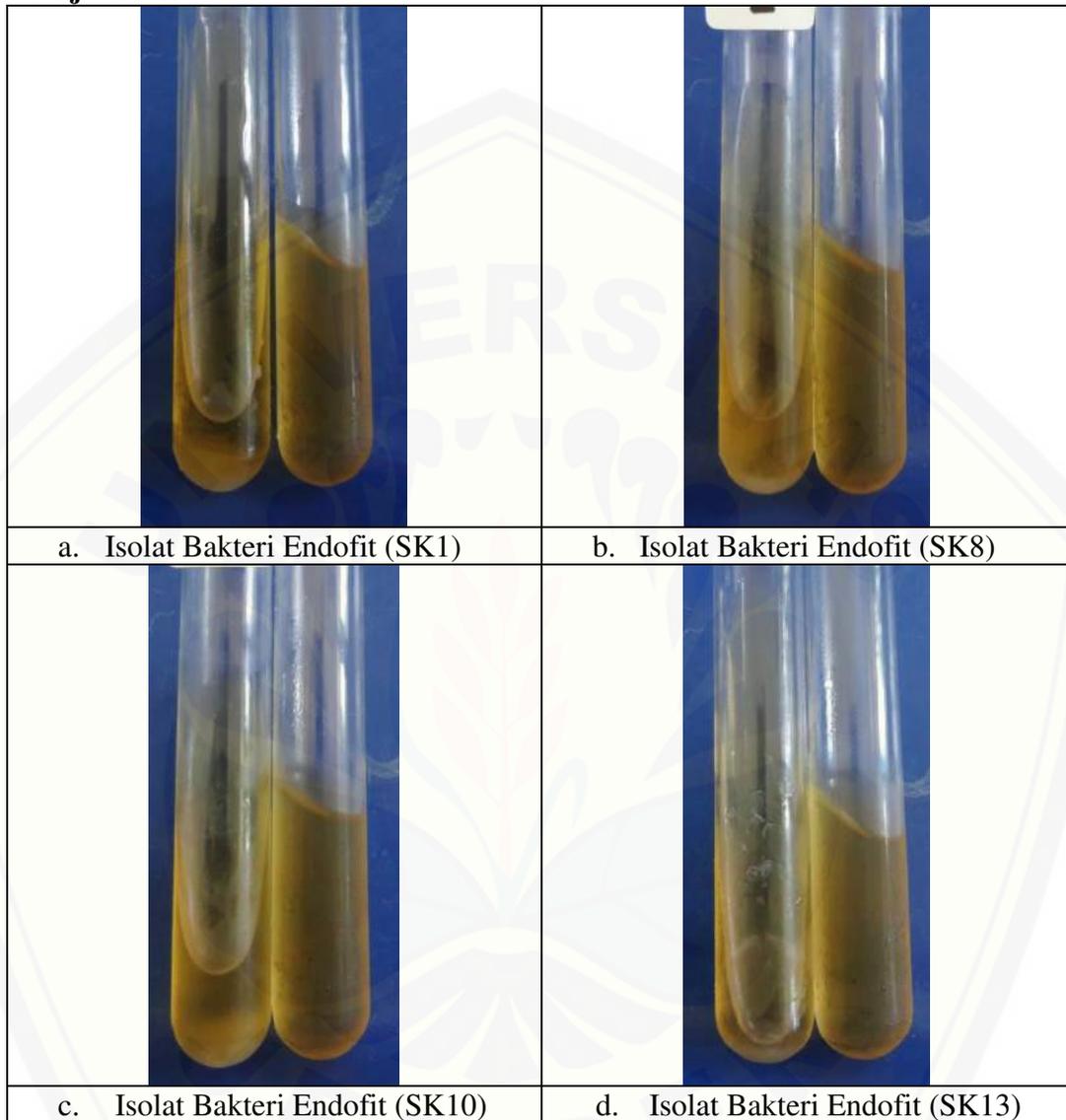
e. Isolat Bakteri Endofit (SK13)



f. Isolat Bakteri Endofit (SK15)

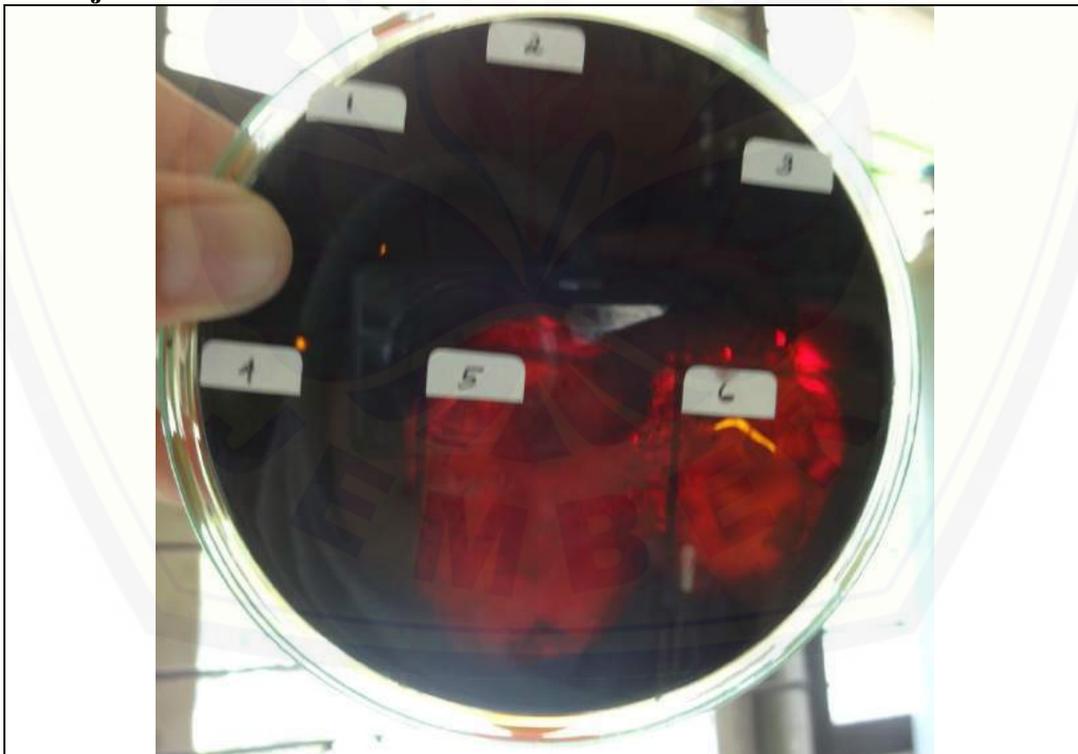


g. Isolat Bakteri Endofit (SK17)

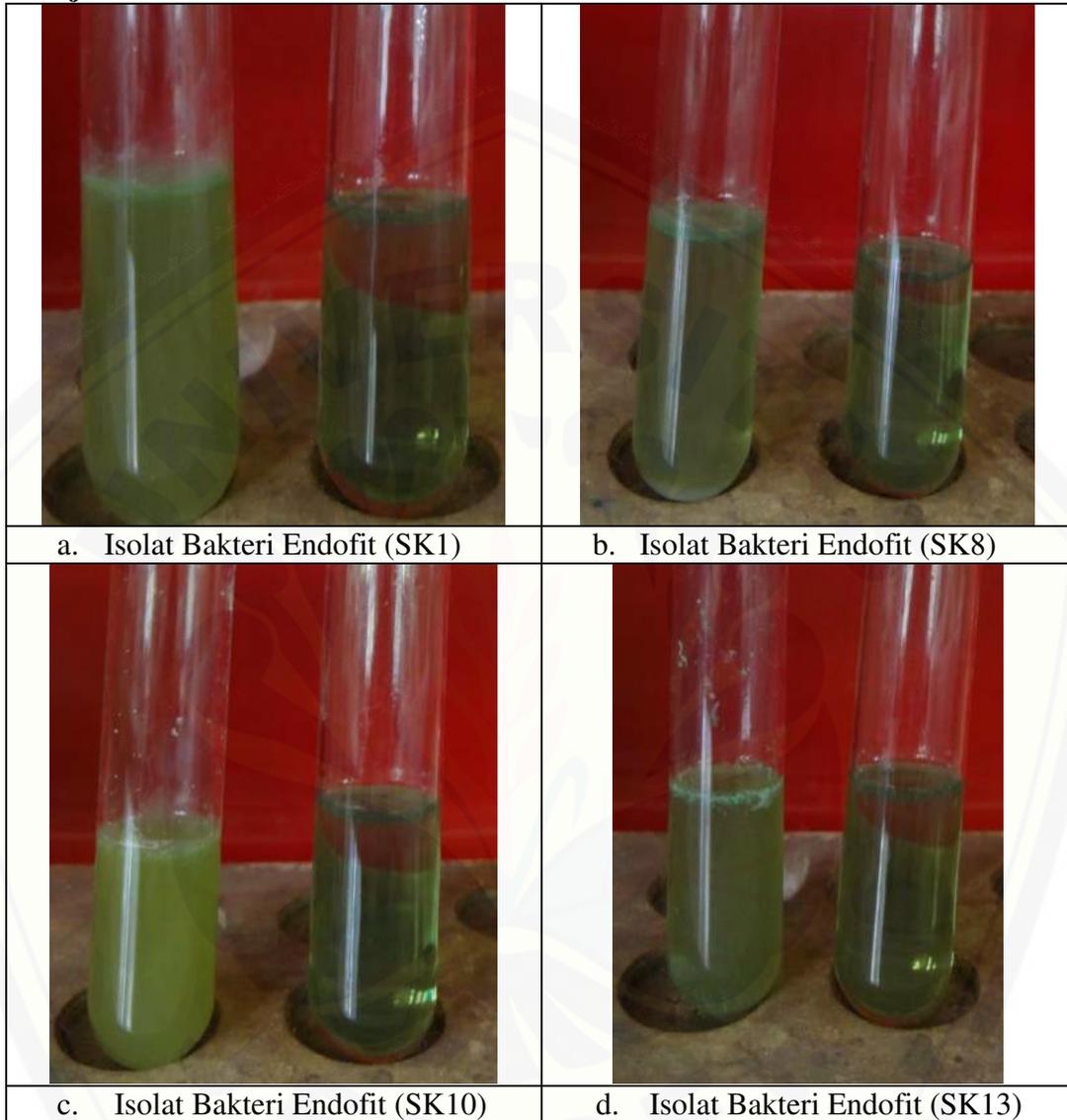
F4. Uji Gelatin

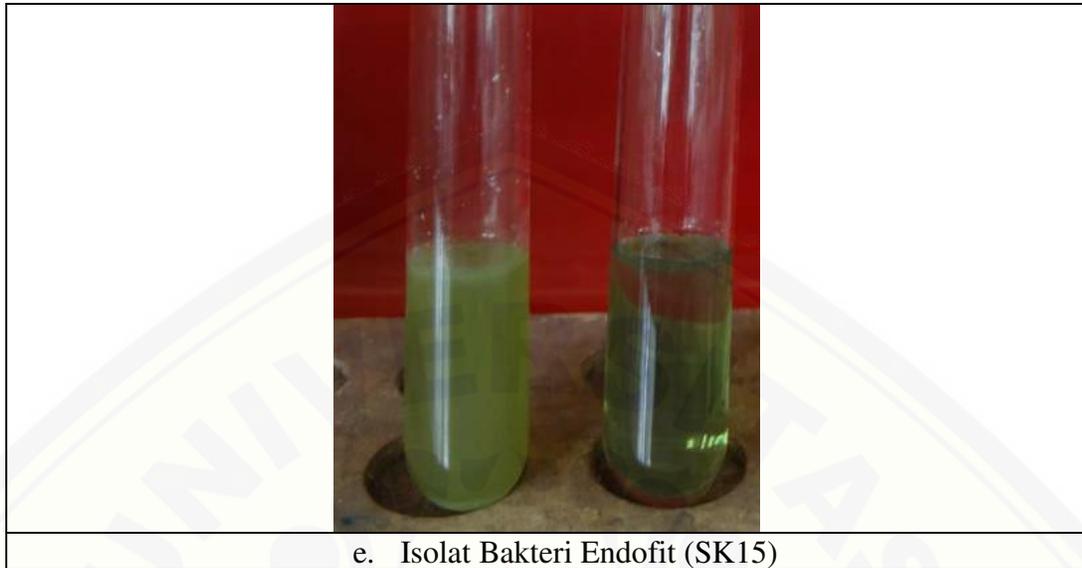


F5. Uji Hidrolisis Pati



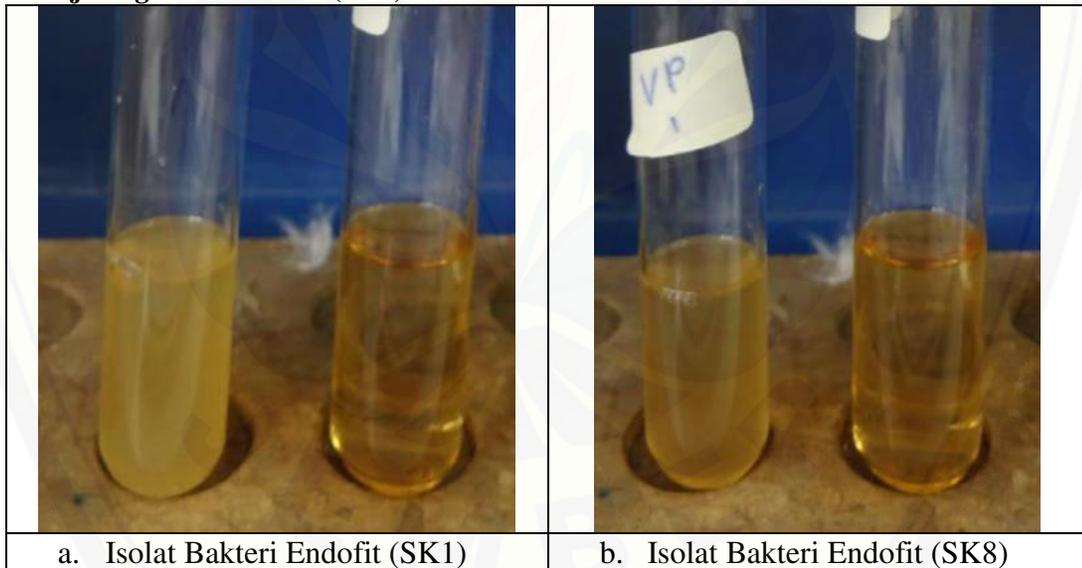
Keterangan: 1. Isolat Bakteri SK8, 2. Isolat Bakteri SK10, 3. Isolat Bakteri SK15, 4. Isolat Bakteri SK1, 5. Isolat Bakteri SK13, 6.-

F6. Uji Indol



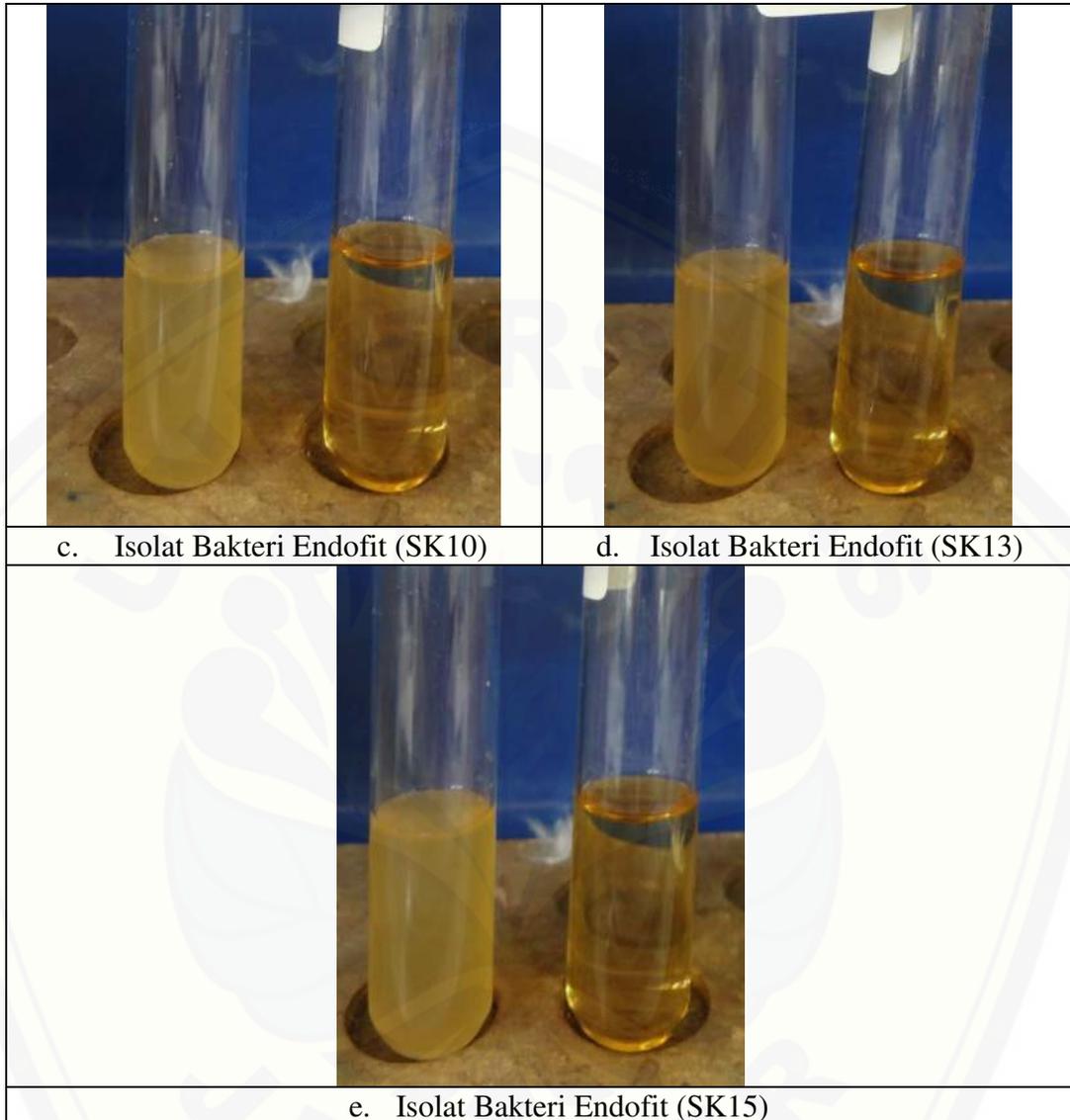
e. Isolat Bakteri Endofit (SK15)

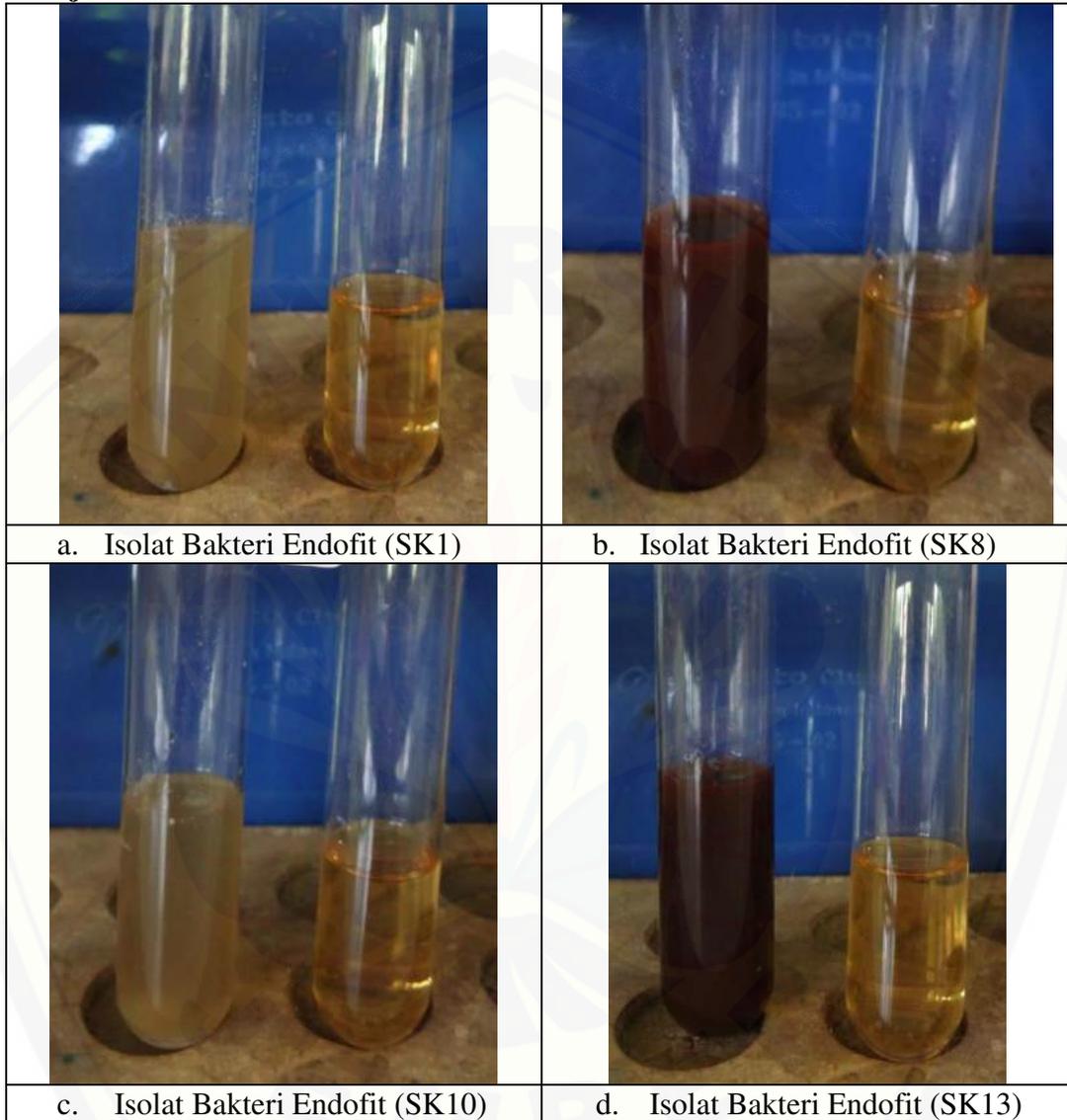
F7. Uji Voges Proskauer (V-P)

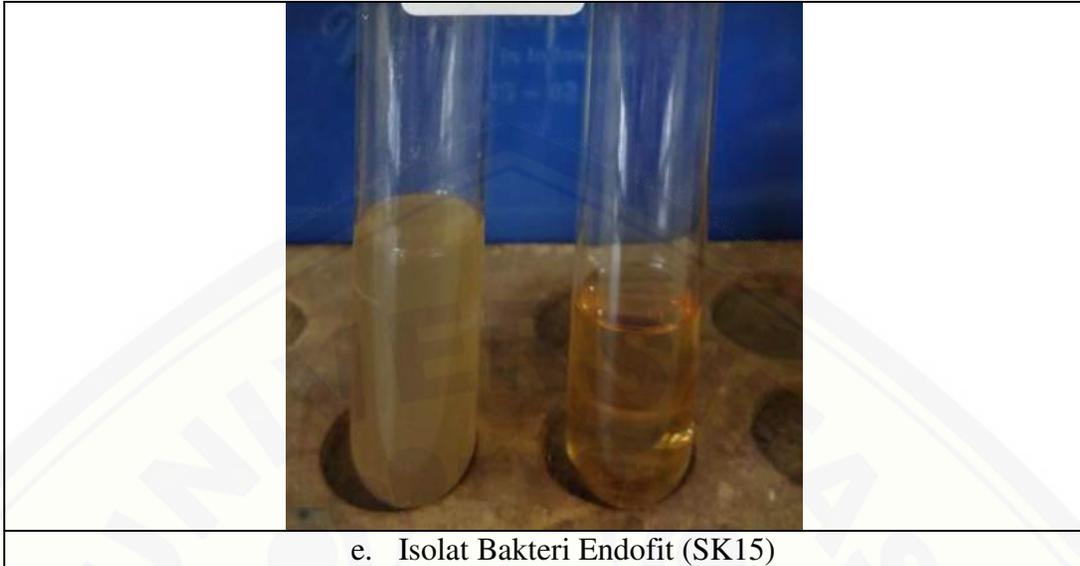


a. Isolat Bakteri Endofit (SK1)

b. Isolat Bakteri Endofit (SK8)

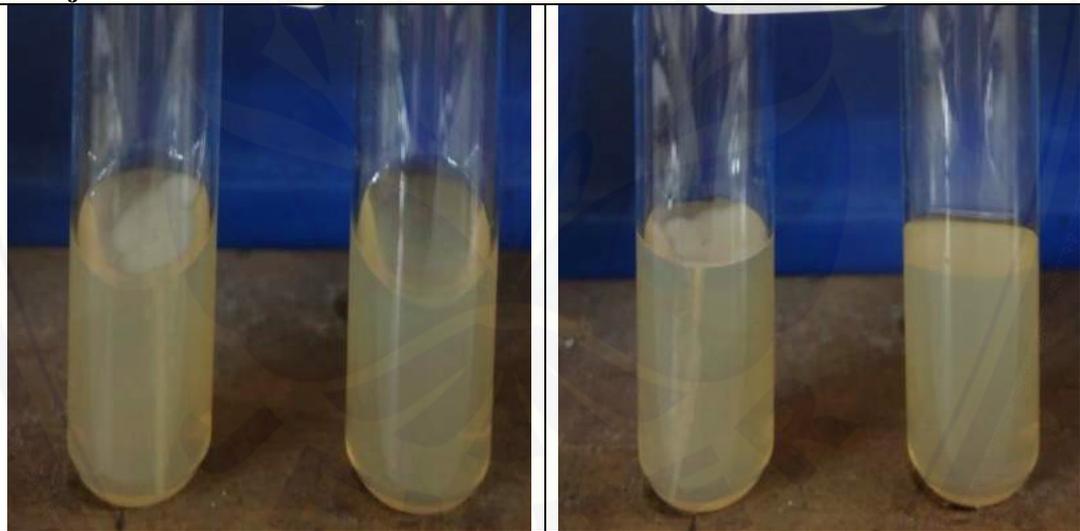


F8. Uji Reduksi Nitrat



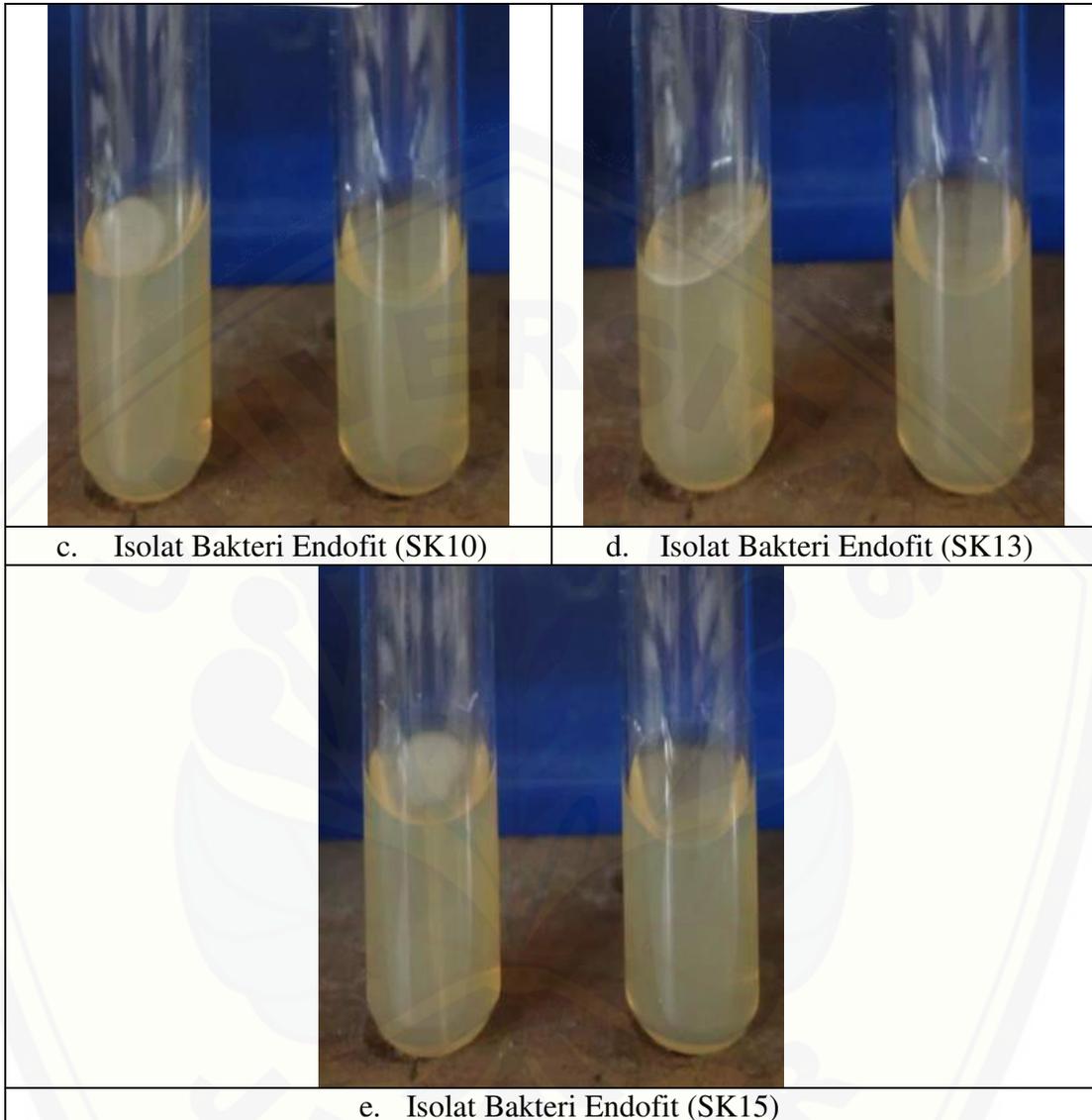
e. Isolat Bakteri Endofit (SK15)

F9. Uji Hidrolisis Urea



a. Isolat Bakteri Endofit (SK1)

b. Isolat Bakteri Endofit (SK8)



LAMPIRAN G. ALAT-ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

G1. Alat-Alat Penelitian

No.	Nama	Gambar	No.	Nama	Gambar
1	<i>Autoclave</i>		11	Tabung Reaksi	
2	Kulkas		12	Pipet	
3	<i>Vortex</i>		13	Pinset	
4	Bunsen		14	Mortar dan pistil	

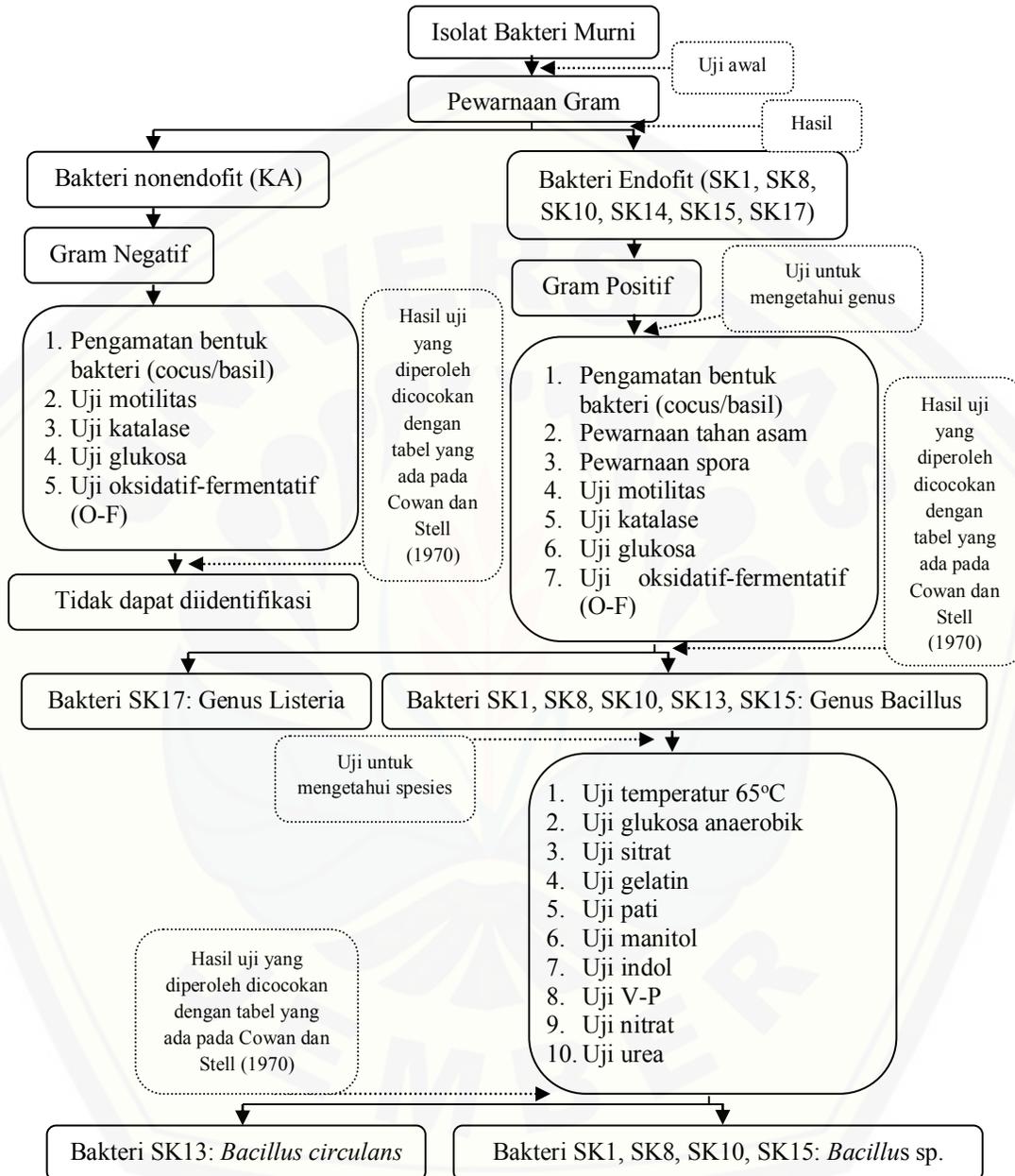
5	Cawan		15	Rak tabung reaksi	
6	Ose		16	Gelas ukur	
7	Jarum N		17	Neraca	
8	Laminar		18	Penangas	
9	Mikroskop		19	Oven	

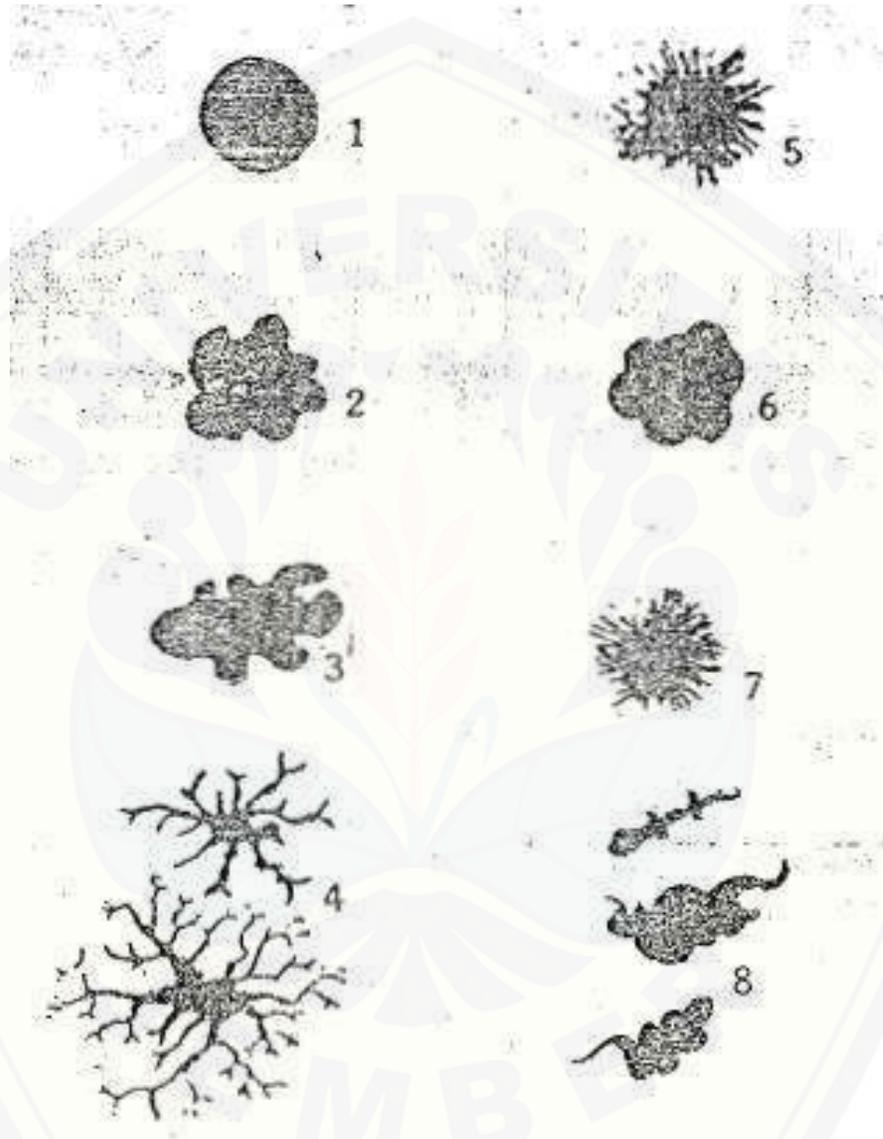
10	Inkubator				
----	-----------	---	--	--	--

G2. Bahan-Bahan Penelitian

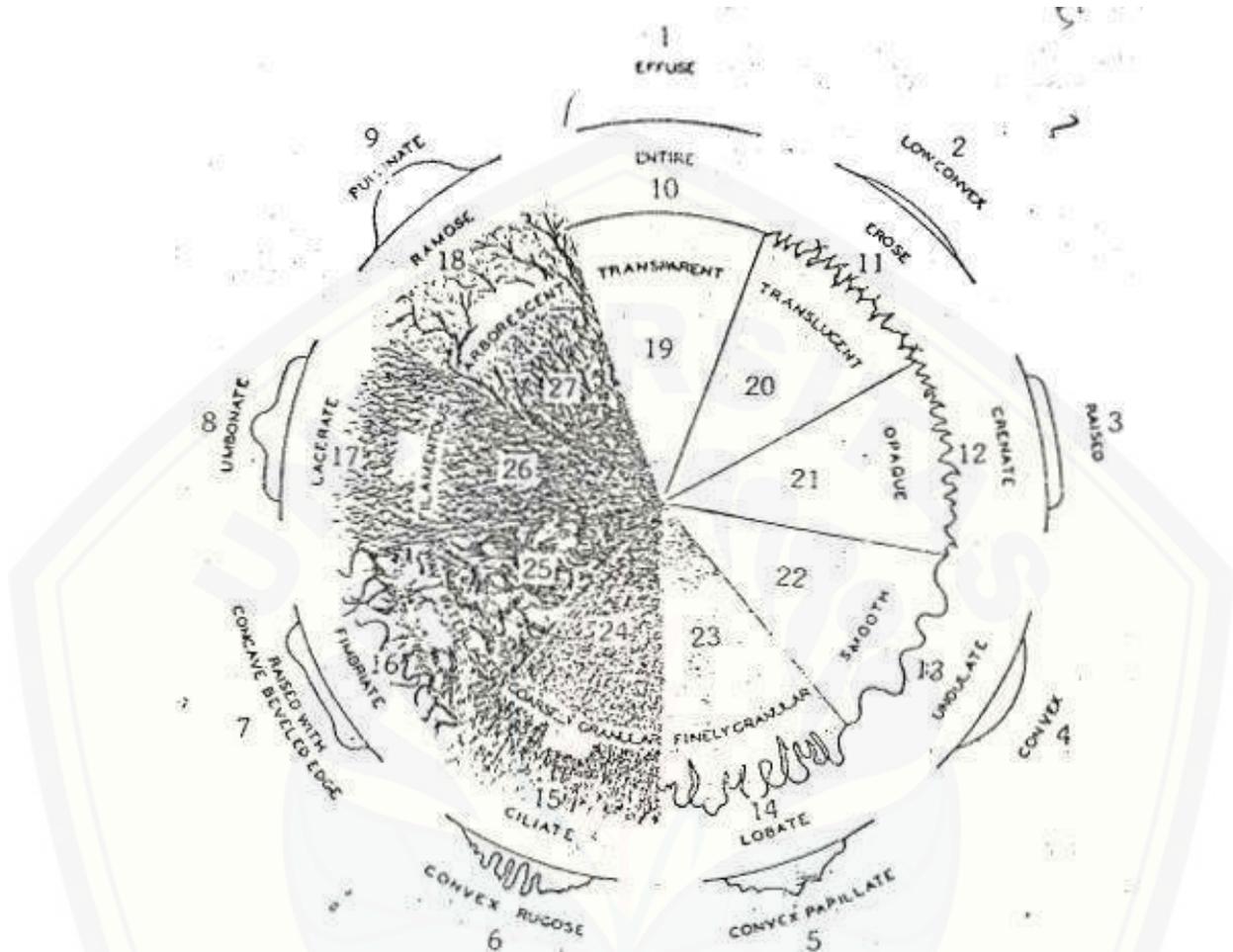
No.	Nama	Gambar	No.	Nama	Gambar
1	Medium TSA dan TSB		2	Akar kopi arabika	

LAMPIRAN H. PROSES IDENTIFIKASI BAKTERI



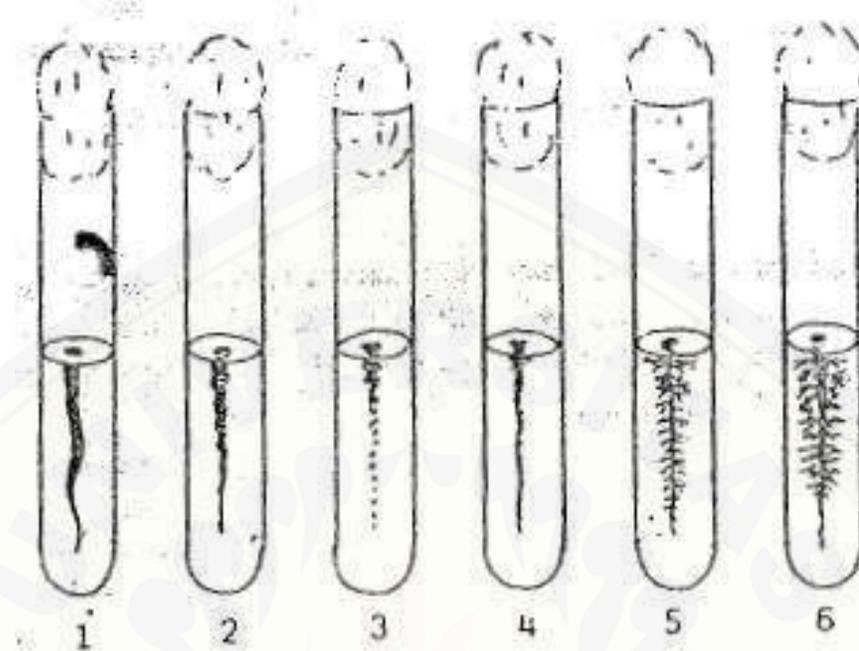
**LAMPIRAN I. PANDUAN PENGAMATAN KARAKTER MORFOLOGI
MAKROSKOPIS****Gambar II.** Bentuk-bentuk koloni (Jutono, 1989: 100).

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| 1. <i>Circular</i> | 5. <i>Filamentous</i> |
| 2. <i>Irregular</i> | 6. <i>Curied</i> |
| 3. <i>Amoeboid</i> | 7. <i>Myceloid</i> |
| 4. <i>Rhizoid</i> | 8. <i>Toruloid</i> |



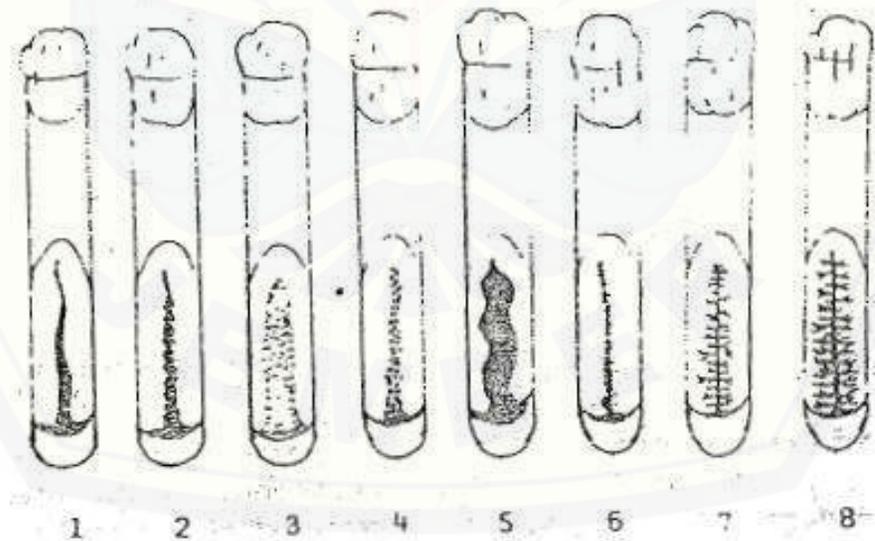
Gambar I2. Bentuk elevasi, tepi dan struktur dalam koloni bakteri (Jutono, 1989: 101).

- | | | |
|--|----------------------|------------------------------|
| A. Elevasi | B. Tepi | C. Struktur dalam |
| 1. <i>Effuse</i> | 10. <i>Entire</i> | 19. <i>Transparent</i> |
| 2. <i>Low convex</i> | 11. <i>Erose</i> | 20. <i>Translucent</i> |
| 3. <i>Raised</i> | 12. <i>Crenate</i> | 21. <i>Opaque</i> |
| 4. <i>Convex</i> | 13. <i>Undulate</i> | 22. <i>Smooth</i> |
| 5. <i>Convex papillate</i> | 14. <i>Lobate</i> | 23. <i>Finely granular</i> |
| 6. <i>Convex rugose</i> | 15. <i>Ciliate</i> | 24. <i>Coarsely granular</i> |
| 7. <i>Raised with concave beveled edge</i> | 16. <i>Fimbriate</i> | 25. <i>Wavy enterlocked</i> |
| 8. <i>Umbonate</i> | 17. <i>Lacerate</i> | 26. <i>Filamentous</i> |
| 9. <i>Puluinate</i> | 18. <i>Ramose</i> | 27. <i>Arborescent</i> |



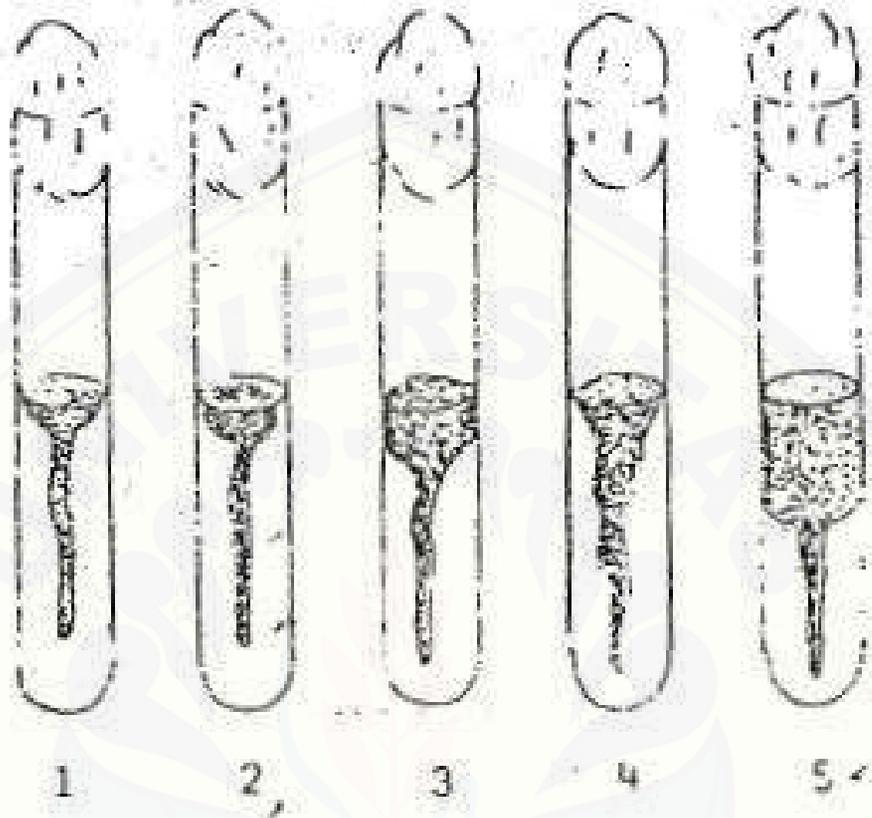
Gambar I3. Bentuk koloni medium nutrisi agar tegak (Jutono, 1989: 101).

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1. <i>Filiform</i> | 4. <i>Villous</i> |
| 2. <i>Echinulate</i> | 5. <i>Rhizoid</i> |
| 3. <i>Beaded</i> | 6. <i>Arborescent</i> |



Gambar I4. Bentuk koloni pada medium nutrisi agar miring (Jutono, 1989: 102).

- | | | |
|----------------------|---------------------|-----------------------|
| 1. <i>Filiform</i> | 4. <i>Beaded</i> | 7. <i>Rhizoid</i> |
| 2. <i>Echinulate</i> | 5. <i>Spreading</i> | 8. <i>Arborescent</i> |
| 3. <i>Effuse</i> | 6. <i>Plumose</i> | |



Gambar 15. Tipe-tipe pencairan pada medium nutrisi gelatin tegak (Jutono, 1989: 102).

1. *Crateriform*
2. *Napiform*

3. *Infundibuliform*
4. *Soccate*

5. *Stratiform*

Arti Istilah-Istilah

<i>Amoeboid</i>	: seperti amoeba
<i>Arborescent</i>	: menyerupai pohon yang bercabang-cabang
<i>Beaded</i>	: seperti rangkaian mutiara (butir-butir) sepanjang bekas inokulasi
<i>Brittle</i>	: pertumbuhan yang kering dan mudah pecah (getas, rapuh) jika disentuh dengan ose
<i>Butyrous</i>	: konsistensi bakteri yang menyerupai mentega
<i>Chromogenesis</i>	: pembentukan senyawa-senyawa yang berwarna oleh mikroba
<i>Contoured</i>	: permukaan yang bergelombang seperti peta relief
<i>Convex</i>	: cembung
<i>Crateriform</i>	: pencairan medium gelatin berbentuk menyerupai piring
<i>Cretaceous</i>	: seperti kapur (mengandung kapur)
<i>Cuneate</i>	: seperti biji
<i>Curled</i>	: keriting, berkerut, seperti rantai sejajar yang bergelombang
<i>Echinulate</i>	: pertumbuhan sepanjang bekas inokulasi bergerigi atau berbintik-bintik
<i>Effuse</i>	: pertumbuhan tipis, biasanya merata
<i>Entire</i>	: rata
<i>Erose</i>	: seperti potongan-potongan yang tidak teratur
<i>Filamentous</i>	: bentuk menyerupai benang-benang
<i>Filiform</i>	: pertumbuhan sepanjang bekas inokulasi merata
<i>Flat</i>	: mendatar
<i>Fluorescent</i>	: berwarna jika kena sinar atau pantulan sinar
<i>Infundibuliform</i>	: bentuk menyerupai cerobong atau kerucut terbalik
<i>Lobate</i>	: terdapat bentuk-bentuk seperti telinga
<i>Membranous</i>	: pertumbuhan tipis menyerupai membran

<i>Myceloid</i>	: seperti pertumbuhan jamur dengan benang-benang radier
<i>Napiform</i>	: bentuk seperti buah lobak (wortel)
<i>Opalescent</i>	: putih seperti susu, menyerupai batu opal
<i>Opaque</i>	: tak dapat ditembus cahaya
<i>Papillate</i>	: bentuk cembung dengan tonjolan (bintil) tumpul
<i>Pellicle</i>	: pertumbuhan pada permukaan medium cair (selaput)
<i>Plumose</i>	: pertumbuhan menyerupai bulu
<i>Pulvinate</i>	: seperti bantal
<i>Punciform</i>	: kecil sekali (seperti titik) tetapi masih dapat dilihat dengan mata biasa, diameter kurang dari 1 mm
<i>Raised</i>	: pertumbuhan tebal dengan tepi yang kasar
<i>Rhizoid</i>	: pertumbuhan dengan cabang-cabang tidak teratur atau seperti susunan akar
<i>Ring</i>	: pertumbuhan pada tepi permukaan medium cair melekat pada gelas
<i>Rugose</i>	: berkerut, berlipat
<i>Saccate</i>	: pencairan pada medium gelatin dengan bentuk seperti kantong panjang, tabung atau silinder
<i>Slimy</i>	: seperti lendir
<i>Spreading</i>	: pertumbuhan merata beberapa mm di sekitar garis (bekas) inokulasi
<i>Stratiform</i>	: pencairan pada medium gelatin, secara horizontal dimulai dari atas dekat dinding terus ke bawah
<i>Toruloid</i>	: bentuk seperti torula (torula adalah jenis khamir yang tidak membentuk spora)
<i>Translucent</i>	: meneruskan sinar meskipun benda di bawahnya tidak terlihat dengan jelas
<i>Umbonate</i>	: pertumbuhan tebal dengan tonjolan tumpul

<i>Undulate</i>	: bergeombang
<i>Verrucose</i>	: permukaannya tertutup bintik-bintik (kutil-kutil)
<i>Villous</i>	: bentuknya pendek, tebal dan permukaannya seperti rambut
<i>Viscid</i>	: suatu pertumbuhan yang jika disentuh ose akan menunjukkan gejala seperti benang (mulur) (Jutono, 1989: 104-105).



LAMPIRAN J. LEMBAR KONSULTASI PENYUSUNAN SKRIPSI**J1. Lembar Konsultasi Penyusunan Skripsi Pembimbing Utama**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Jalan Kalimantan Nomor 37 Kampus Bumi Tegalboto Jember 68121

Telepon: 0331-334988, 330738 Fax: 0331-332475

Laman: www.fkip.unej.ac.id

LEMBAR KONSULTASI PENYUSUNAN SKRIPSI**Pembimbing Utama**

Nama : **Yenny Rahma**
 NIM : **120210103101**
 Jurusan/Program Studi : **Pendidikan MIPA/Pendidikan Biologi**
 Judul : **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis***
 Pembimbing Utama : **Dr. Hj. Dwi Wahyuni, M.Kes.**
 Pembimbing Anggota : **Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.**

Kegiatan Konsultasi

No.	Hari/tanggal	Materi Konsultasi	Tanda Tangan Pembimbing
1	8 Oktober 2015	Pengajuan Judul	
2	24 November 2015	Pengajuan BAB 1, 2, dan 3	
3	25 November 2015	Konsultasi BAB 1, 2, dan 3	
4	1 Desember 2015	Revisi BAB 1, 2, dan 3	
5	14 Desember 2015	Revisi BAB 1, 2, dan 3	
6	16 Desember 2015	ACC Seminar Proposal	
7	12 Januari 2016	Seminar Proposal Skripsi	
8	20 April 2016	Penyerahan Hasil Penelitian	
9	22 April 2016	Pengajuan BAB 1, 2, 3, 4, dan 5	
10	26 April 2016	ACC Ujian Skripsi	

Catatan:

1. Lembar ini harus dibawa dan diisi setiap melakukan konsultasi
2. Lembar ini harus dibawa sewaktu seminar proposal skripsi dan ujian skripsi

J2. Lembar Konsultasi Penyusunan Skripsi Pembimbing Anggota

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Jalan Kalimantan Nomor 37 Kampus Bumi Tegalboto Jember 68121

Telepon: 0331-334988, 330738 Fax: 0331-332475

Laman: www.fkip.unej.ac.id

LEMBAR KONSULTASI PENYUSUNAN SKRIPSI**Pembimbing Anggota**

Nama : Yenny Rahma
 NIM : 120210103101
 Jurusan/Program Studi : Pendidikan MIPA/Pendidikan Biologi
 Judul : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Lahan Kopi Arabika yang Terserang Nematoda *Radopholus similis*
 Pembimbing Utama : Dr. Hj. Dwi Wahyuni, M.Kes.
 Pembimbing Anggota : Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.

Kegiatan Konsultasi

No.	Hari/tanggal	Materi Konsultasi	Tanda Tangan Pembimbing
1	8 Oktober 2015	Pengajuan Judul	
2	10 Oktober 2015	Pengajuan BAB 1, 2, dan 3	
3	15 Oktober 2015	Konsultasi BAB 1, 2, dan 3	
4	21 Oktober 2015	Revisi BAB 1, 2, dan 3	
5	28 Oktober 2015	Revisi BAB 1, 2, dan 3	
6	30 Oktober 2015	ACC Seminar Proposal	
7	12 Januari 2016	Seminar Proposal Skripsi	
8	24 Februari 2016	Penyerahan Hasil Penelitian	
9	4 April 2016	Pengajuan BAB 1, 2, 3, 4, dan 5	
10	18 April 2016	Konsultasi BAB 1, 2, 3, 4, dan 5	
11	22 April 2016	Revisi BAB 1, 2, 3, 4, 5	
13	4 Mei 2016	Konsultasi BAB 1, 2, 3, 4, dan 5	
14	9 Mei 2016	ACC Ujian Skripsi	

Catatan:

1. Lembar ini harus dibawa dan diisi setiap melakukan konsultasi
2. Lembar ini harus dibawa sewaktu seminar proposal skripsi dan ujian skripsi