

## Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Patogen pada Tumbuhan Kantong Semar (*Nepenthes gracillis*)

### *Isolation, Characterization, and Identification of Pathogenic Bacteria in Kantong Semar Plants (*Nepenthes gracillis*)*

Rahmat Agus Prastio\*, Isnawati, Dwi Anggorowati Rahayu

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya

\*e-mail: rahmat.17030244047@mhs.unesa.ac.id

**Abstrak.** *Nepenthes* merupakan tumbuhan karnivora dilindungi dan unik karena memiliki kantong berisi cairan pada ujung daun yang berfungsi sebagai perangkap serangga. Keberadaan *Nepenthes gracillis* dalam ekosistem terancam punah, yang salah satunya disebabkan serangan bakteri patogen, maka perlu adanya identifikasi bakteri patogen yang menyerang *N. gracillis* sebagai upaya penanganan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi, mengkarakterisasi dan mengidentifikasi bakteri patogen pada *N. gracillis* menggunakan metode karakterisasi morfologi, uji hipersensitif, uji patogenisitas dan analisis BLAST hasil sekuensing gen *16S rRNA* pada *GenBank* NCBI. Hasil uji hipersensitif dan uji patogenisitas menunjukkan isolat bakteri A1 merupakan bakteri patogen tanaman yang menyerang *N. gracillis* dengan karakteristik morfologi yang sama dengan bakteri genus *Erwinia*, yaitu bakteri gram negatif, *diplococcus*, bentuk koloni bulat, tepi koloni rata, warna koloni putih krem, permukaan koloni cembung, dan sekuensing gen *16S rRNA* menunjukkan isolat bakteri A1 yang berhasil diisolasi memiliki panjang DNA 900 bp, analisis BLAST pada *GenBank* NCBI isolat bakteri A1 memiliki similaritas 97,33% dengan bakteri patogen *Erwinia aphidicola*. Hal ini dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri A1 yang menyebabkan penyakit bintil dan bercak merah pada daun *N. gracillis* merupakan bakteri patogen tanaman dari genus *Erwinia*.

**Kata kunci:** bakteri pathogen; identifikasi; *Nepenthes gracillis*; sekuen gen *16S rRNA*

**Abstract.** *Nepenthes* is a protected and unique carnivorous plant because it has a fluid-filled pouch at the end of the leaf that serves as an insect trap. The existence of *Nepenthes gracillis* in ecosystems is endangered, one of the reason is caused by the attack of pathogenic bacteria, so it is necessary to identify pathogenic bacteria that attack *N. gracillis* as an effort to handle. The purpose of this study were to isolate, characterized and identify pathogenic bacteria in *N. gracillis* using morphological characterization methods, hypersensitivity tests, pathogenicity tests and BLAST analysis of *16S rRNA* gene sequencing results on NCBI *GenBank*. Hypersensitivity test results and pathogenicity test showed that isolate of bacteria A1 is a plant pathogenic bacteria that attacks *N. gracillis* with morphological characteristics same as the bacterium genus *Erwinia*, gram-negative bacteria, *diplococcus*, round colony shape, flat colony edge, creamy white colony color, convex colony surface, and gene sequencing *16S rRNA* showed that the isolate of A1 bacteria that were successfully isolated had a DNA length of 900 bp, BLAST analysis on *GenBank* NCBI bacterial isolate A1 had a similarity of 97.33% with the pathogenic bacteria *Erwinia aphidicola*. So it can be concluded that the isolate of bacteria A1 that causes bintil disease and red patches on the leaves of *N. gracillis* is a plant pathogenic bacteria of the genus *Erwinia*.

**Kata kunci:** pathogenic bacteria; identification; *Nepenthes gracillis*; *16S rRNA* gene sequencing

## PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara tropis dengan kekayaan dan keanekaragaman plasma nutfah. Salah satunya yaitu *Nepenthes*. *Nepenthes* merupakan tumbuhan khas dari daerah iklim tropis yang biasa disebut dengan nama lokal Kantong Semar. Tumbuhan *Nepenthes* merupakan genus dari Famili *Nepenthaceae* yang dikategorikan sebagai satu-satunya tumbuhan karnivora dengan kemampuan bertahan hidup memangsa serangga di habitat dengan unsur nitrogen yang rendah (Mansur, 2016). *Nepenthes* dapat beradaptasi dengan baik di tanah dengan tingkat keasaman yang tinggi dan

kandungan unsur hara esensial seperti, unsur nitrogen, unsur fosfor, dan unsur kalium sangat rendah yang pada umumnya tumbuhan lain sukar hidup (Mardhiana *et al.*, 2012).

*Nepenthes* beradaptasi untuk memenuhi kebutuhan hidupnya dari lingkungan ekstrem dengan melakukan adaptasi morfologis dan fisiologis. Adaptasi morfologis dilakukan dengan memodifikasi ujung daun berbentuk kantung, sedangkan adaptasi fisiologis *Nepenthes* dengan cara mensekresikan enzim protease pada cairan kantung (Mardhiana *et al.*, 2012). Kantung *Nepenthes* berfungsi sebagai perangkap serangga dengan cara menarik, menangkap, dan membunuh serangga yang masuk ke dalam kantung yang berisi cairan lalu mencernanya sebagai sumber nutrisi tambahan (Hidayat, 2015).

Keberadaan *Nepenthes* di alam memiliki peranan yang penting dalam suatu ekosistem. *Nepenthes* mempunyai manfaat sebagai agen pengendali hayati dengan menjadikan serangga sebagai sumber nitrogen (Mardhiana *et al.*, 2012). Fitriani (2016), menyatakan bahwa *Nepenthes* memiliki simbiosis dengan bakteri kitinolitik yang dapat ditemui pada cairan kantung *Nepenthes*, dimana bakteri ini dapat digunakan sebagai pengendali hayati yang potensial dan ramah lingkungan untuk menangani hama dan patogen khususnya serangga pada tanaman budidaya (Fitriani, 2016). Dalam cairan *Nepenthes* juga terdapat bakteri penghasil antibiotik, pada penelitian yang dilakukan Hidayat (2015) diketahui isolat bakteri yang diisolasi pada cairan kantung *Nepenthes* memiliki sifat antagonisme terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

*Nepenthes* mempunyai ciri khas keindahan corak, warna, dan bentuk kantung yang unik pada sulur ujung daun, sehingga banyak diminati sebagai tanaman hias (Isnaini, 2017). Kepopuleran *Nepenthes* semakin meningkat karena tingginya minat masyarakat membudidayakan *Nepenthes* sebagai tanaman hias (Fanani *et al.*, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Suwardi *et al.*, (2015), menyatakan bahwa berbagai jenis *Nepenthes* di Hutan Rawa Gambut Kalimantan Barat terancam punah akibat rusaknya lingkungan hidup *Nepenthes*, kebakaran hutan dan ladang berpindah, serta kegiatan para kolektor, pecinta *Nepenthes*, dan penggemar tanaman hias karnivora yang melakukan eksploitasi berlebihan di alam.

Serangan bakteri patogen juga menjadi salah satu penyebab berkurangnya jumlah *Nepenthes* di habitatnya sehingga terancam punah. Penelitian Fanani *et al.*, (2016), mengidentifikasi secara fenotip bakteri patogen yang menyebabkan penyakit terhadap *Nepenthes mirabilis*, *Nepenthes ampullaria*, dan *Nepenthes rafflessiana* dengan metode konvensional diperoleh hasil penyebab penyakit *Nepenthes* yang diakibatkan bakteri patogen berasal dari genus *Erwinia* menyebabkan bercak berwarna merah kecokelatan pada permukaan daun *N. mirabilis*. Genus *Pseudomonas* menyebabkan warna kehitaman, busuk hingga mengering pada permukaan batang *N. rafflessiana* dan *N. ampullaria*. Genus *Xanthomonas* menyebabkan bintik kuning menggerombol, hingga menyebar keseluruhan permukaan daun *N. rafflessiana* dan *N. ampullaria*.



**Gambar 1.** Daun *Nepenthes gracillis* yang terinfeksi bakteri patogen

Bakteri patogen dapat menyebabkan berbagai macam penyakit pada tanaman inang, karena bakteri patogen yang hidup pada jaringan tanaman dapat mengakibatkan perubahan morfologi dan terganggunya fungsi suatu jaringan tanaman (Afifah *et al.*, 2017). Pada umumnya bakteri patogen tanaman tidak langsung masuk ke dalam sel tanaman, namun dengan memperbanyak diri pada ruang antar sel. Bakteri patogen dapat masuk melalui lubang alami pada tanaman, yaitu pada stomata, lentisel, hidatoda, dan luka pada jaringan. Bakteri patogen dapat mengekskresikan racun, fitohormon, enzim ekstraseluler, dan polisakarida ekstraseluler (Shivas *et al.*, 2005). Isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada *Nepenthes* sangat penting dilakukan sebagai upaya penanganan *Nepenthes* yang terjangkit penyakit.

Identifikasi bakteri patogen dapat dilakukan secara fenotipik, yaitu identifikasi yang dilakukan berdasarkan pengamatan terhadap morfologi, biokimia, dan fisiologi. Metode ini merupakan identifikasi bakteri secara konvensional meliputi morfologi sel, pewarnaan gram, uji oksidasi, uji biokimia, uji fisiologi dan uji fermentasi untuk membedakan antara jenis bakteri satu dengan jenis bakteri yang lain (Nuritasari *et al.*, 2017). Hasil dari identifikasi fenotipik dilanjutkan dengan identifikasi genomik untuk memperkuat hasil dari identifikasi fenotipik sehingga didapatkan hasil identifikasi yang lebih akurat dan spesifik (Sunaryanto *et al.*, 2012). Identifikasi genomik dapat memperkuat hasil identifikasi fenotipik karena bakteri memiliki sifat statis yang dipengaruhi perubahan kondisi bakteri dalam merespon lingkungan hingga berpotensi terjadinya evolusi pada bakteri (Nuroniyah *et al.*, (2012).

Sekuen gen *16S rRNA* merupakan penanda molekuler yang banyak digunakan dalam identifikasi, filogenetika, dan klasifikasi bakteri karena memiliki sifat ubikuaitas (terdapat pada semua bakteri) dan fungsi yang identik pada semua bakteri (Trisno, 2012). Sekuen gen *16S rRNA* juga dapat digunakan untuk mengetahui sifat lestari (*conserved*) yang diturunkan dari generasi ke generasi (Hamzah, 2018). Barus (2019), mengemukakan bahwa sekuen gen *16S rRNA* memiliki sifat universal, terdapat pada semua materi genetik bakteri, dan *highly conserved*. Daerah gen *16S rRNA* dapat dimanfaatkan dalam melakukan identifikasi pada bakteri yang belum diketahui jenisnya, dan dapat menganalisis hubungan filogenetik dengan taksa yang cukup jauh.

Sekuensing gen *16S rRNA* dapat dimanfaatkan dalam mengidentifikasi bakteri patogen dengan ciri yang sulit teridentifikasi secara fenotip, seperti pada bakteri *Staphylococcus pneumoniae* dan bakteri *Arcobacter*. Wahyudi *et al.*, (2011), mengisolasi bakteri penyebab penyakit hawar pada permukaan daun tanaman padi kemudian mengidentifikasi menggunakan sekuen gen *16S rRNA* didapatkan hasil yang akurat dan spesifik penyebab penyakit hawar terhadap permukaan daun padi yaitu bakteri dari genus *Xanthomonas*.

*Nepenthes* merupakan tumbuhan karnivora dengan status dilindungi oleh Undang-Undang yaitu No. 5 tahun 1990 dan dilindungi oleh Peraturan Pemerintah RI. No. 7 tahun 1999, karena *Nepenthes* merupakan tanaman karnivora dengan status terancam punah akibat eksploitasi berlebihan dan rusaknya habitat *Nepenthes* di alam. Berdasarkan peranan dan manfaat *Nepenthes* bagi ekosistem dan statusnya yang dilindungi karena terancam punah, maka upaya penanganan penyakit pada *Nepenthes* yang disebabkan salah satunya oleh bakteri patogen penting dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan mengidentifikasi bakteri patogen pada *N. gracillis* menggunakan karakteristik morfologi, uji hipersensitif, uji patogenisitas dan analisis BLAST hasil sekuensing pada *GenBank* NCBI, sehingga bakteri yang menyebabkan penyakit bintil dan bercak merah pada daun *N. gracillis* dapat diketahui.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan bulan Oktober 2020 hingga bulan Januari 2021. Sampel diambil dari Taman Nasional Bromo Tengger Semeru. Isolasi dan kultur bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Gedung C9 Universitas Negeri Surabaya, sedangkan analisis molekuler berdasarkan penanda gen *16S rRNA* dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekuensing dilakukan menggunakan jasa sekuensing First Base Laboratories Sdn Bhd.

Bahan penelitian yang digunakan antara lain, media tumbuh bakteri *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Both* (NB), sodium hipoklorit 5,3%, akuades steril, alkohol 70%, alkohol 96%, *crystal violet*, *lugol*, safranin, *big dye terminator cycle sequencing kit*, berupa larutan buffer GT1, buffer GT2, buffer W2, *elution buffer*, agarose, 1x TAE buffer, *loading dye*, etidium bromide (EtBr), proteinase K, *DNA sequencer* dan primer *16S universal*, yaitu *1492 Reverse* (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), dan *27 Forward* (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3').

Alat yang digunakan yaitu cawan petri, alu, mortar, vortex, timbangan analitik, pipet tetes, *beaker glass*, inkubator, LAF, *object glass*, *cover glass*, ose, mikropipet, erlenmeyer, *hotplate*, *aluminium foil*, tabung appendorf, tabung reaksi, *thermocycler*, UV transilluminator dan autoklaf.

Proses isolasi bakteri dilakukan dengan mengambil sampel dari *Nepenthes* yang menunjukkan adanya gejala penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen, yaitu terdapat bintil dan bercak merah menyebar pada permukaan daun, batang, dan kantong *Nepenthes*, sehingga menyebabkan jaringan *Nepenthes* mati, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Fanani *et al.*, (2015). Isolasi bakteri dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Safira *et al.*, (2014), bagian daun *Nepenthes* yang mengalami gejala terserang penyakit dan masih segar dicuci menggunakan air bersih yang mengalir,

dilanjutkan dengan memotong daun dengan ukuran 1 cm hingga 3 cm, potongan daun direndam menggunakan larutan alkohol 70% selama waktu 30 detik, hipoklorit 5,25% 1 menit, daun sampel kemudian dibilas akuades steril dengan tiga kali pengulangan, selanjutnya dikeringkan menggunakan kertas saring yang sebelumnya telah disterilisasi. Daun yang telah dibersihkan ditumbuk dengan mortar dan alu, ditambahkan akuades steril 10 ml, kemudian dilakukan pengenceran hingga  $10^{-7}$ .

Isolasi bakteri pada media NA dilakukan menggunakan metode *pour plate*, yang setelahnya dilakukan inkubasi dengan suhu ruang dalam kurun waktu 24 jam. Pemurnian dilakukan dengan mengambil koloni bakteri yang tumbuh menggunakan jarum ose dan digoreskan pada media NA, kultur bakteri yang tumbuh diamati morfologinya berdasarkan, warna, bentuk, permukaan, tepian koloni bakteri, dan hasil pewarnaan gram. Kemudian dilakukan perbanyakkan kultur bakteri pada media NB untuk dilakukan uji patogenisitas pada tanaman *N. gracillis* yang sehat.

Uji patogenisitas dilakukan dengan menginokulasi suspensi bakteri  $10^8$  sel/ml pada tanaman *N. gracillis* yang sehat, bakteri patogen akan menyebabkan gejala penyakit berupa bercak dan bintil merah pada permukaan daun, uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah isolat bakteri merupakan bakteri patogen penyebab penyakit pada *N. gracillis* atau hanya bakteri epifit.

Uji hipersensitif dilakukan dengan menginfiltrasikan suspensi bakteri  $10^8$  sel/ml pada daun tanaman tembakau, uji ini dilakukan untuk membuktikan apakah benar isolat bakteri adalah spesifik bakteri patogen pada tanaman, gejala hipersensitif ditunjukkan dengan adanya nekrosis atau mengeringnya bagian daun tembakau yang diinfiltrasikan suspensi bakteri. Uji hipersensitif dilakukan pada tanaman tembakau karena tanaman tembakau mampu mengalokasikan serangan bakteri patogen sebagai respon ketahanan tanaman tembakau terhadap penyakit (Schaad *et al.*, 2001).

Isolasi DNA bakteri dilakukan menggunakan metode CTAB/NaCl, dengan mensentrifugasi 1,5 ml kultur bakteri A1 dengan menambahkan buffer GT1 sebanyak 180  $\mu$ l disentrifugasi 3000 rpm selama 2 menit, pelet kemudian diresuspensi dengan 200  $\mu$ l larutan buffer GT2 dan larutan proteinase K, suspensi kemudian diinkubasi pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, suspensi kemudian ditambahkan 200  $\mu$ l etanol absolut, lalu dihomogenkan. Suspensi dimasukkan pada *Spin Coloumn* lalu disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit, *flow-through* dibuang lalu tambahkan 500  $\mu$ l buffer W1 pada *Spin Coloumn* lalu disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit, *flow-through* kemudian disentrifuge lagi 13.000 rpm selama 2 menit. DNA yang terdapat di *Spin Coloumn* dipindahkan pada *tube* baru 1,5 ml. Pelet kemudian diresuspensi dengan ditambahkan kisaran 50  $\mu$ l hingga 100  $\mu$ l elution buffer dan diinkubasi suhu ruang selama 1 menit, kemudian dilanjutkan sentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit, untai DNA dipurifikasi untuk tahap selanjutnya, DNA yang telah dipurifikasi disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk penyimpanan jangka pendek.

Hasil isolasi kemudian diamplifikasi menggunakan mesin *PCR Biorad* dengan volume akhir 30  $\mu$ l, yang terdiri dari *PCR Master Mix Nexpro* 15  $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l sampel bakteri A1 DNA Template (100 ng/ $\mu$ l), 7,5  $\mu$ l *Water*, 2,5  $\mu$ l primer (primer forward dan reverse masing-masing 10 pmol). Primer yang digunakan untuk amplifikasi adalah 16S universal 1492 *Reverse* (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), dan 27 *Forward* (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3').

Amplifikasi dilakukan dalam 40 siklus, tahap awal amplifikasi yaitu pre-denaturasi dilakukan pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  kurun waktu 120 detik, denaturasi pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  kurun waktu 30 detik, selanjutnya yaitu tahap *annealing* pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, tahap ekstensi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit, kemudian tahap *post elongation* pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  kurun waktu 7 menit.

Elektroforesis dilakukan setelah tahap amplifikasi untuk mengetahui berat molekul DNA yang berhasil diamplifikasi. Pada tahap elektroforesis, sejumlah 2  $\mu$ L ampikon ditambahkan sebanyak 2  $\mu$ L *loading dye* selanjutnya diinfiltrasikan pada sumuran gel agarose. Pembuatan gel agarose yaitu dengan cara menambahkan agarose konsentrasi 1% (agarose 0,5 g dan 50 mL larutan buffer *Tris-acetate-EDTA* (TAE)) dengan larutan Etidium Bromida (EtBr) sebanyak 4  $\mu$ L. Elektroforesis diatur pada tegangan 140 V. *DNA ladder* ukuran 1 kb dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose untuk mengetahui panjang untai basa DNA target, dan UV transilluminator digunakan untuk memvisualisasikan pita DNA pada media gel agarose. Hasil dari visualisasi UV transilluminator kemudian didokumentasikan.

Sekuensing menggunakan metode Sanger (1997), untuk mengetahui urutan basa nitrogen pada sekuen gen 16S *rRNA* yang berhasil diamplifikasi. Hasil dari PCR dilakukan sekuensing dengan mengirimkan ke *First Base, Malaysia*. Hasil dari sekuensing berupa kromatogram. Kromatogram hasil sekuensing kemudian divisualisasi menggunakan program *software* FinchTV, urutan basa nitrogen gen 16S *rRNA* kemudian dilakukan BLAST pada *GenBaank* NCBI dengan cara membuka website:

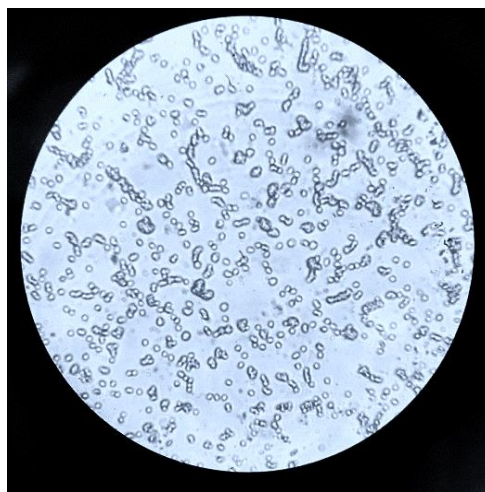
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. BLAST dilakukan untuk mengetahui nilai similaritas urutan basa nukleotida bakteri target dengan kerabatnya.

## HASIL

Isolasi bakteri dari *N. gracillis* yang terjangkit penyakit (Gambar 1) didapatkan lima isolat yaitu A1, A2, A3, A4, dan A5. Koloni yang tumbuh mempunyai karakteristik yang sama berdasarkan karakterisasi morfologi koloni bakteri dan sel bakteri, yaitu warna koloni, tepian koloni, permukaan koloni, bentuk bakteri, dan pewarnaan gram (Tabel 1).

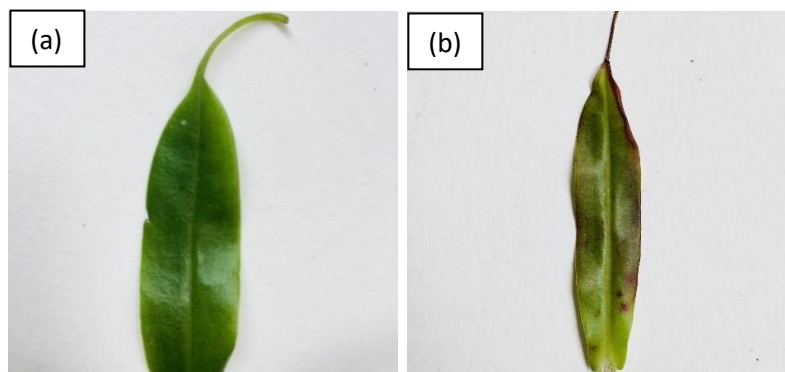
**Tabel 1.** Karakterisasi morfologi pada koloni bakteri dan sel bakteri

Isolat	Bentuk Bakteri	Morfologi Koloni				
		Bentuk	Tepi	Warna	Permukaan	Pewarnaan Gram
A1	<i>Diplococcus</i>	Bulat	Rata	Putih Krem	Cembung	Gram Negatif
A2	<i>Diplococcus</i>	Bulat	Rata	Putih Krem	Cembung	Gram Negatif
A3	<i>Diplococcus</i>	Bulat	Rata	Putih Krem	Cembung	Gram Negatif
A4	<i>Diplococcus</i>	Bulat	Rata	Putih Krem	Cembung	Gram Negatif
A5	<i>Diplococcus</i>	Bulat	Rata	Putih Krem	Cembung	Gram Negatif



**Gambar 2.** Bentuk sel bakteri *diplococcus* diamati dengan mikroskop perbesaran 100x

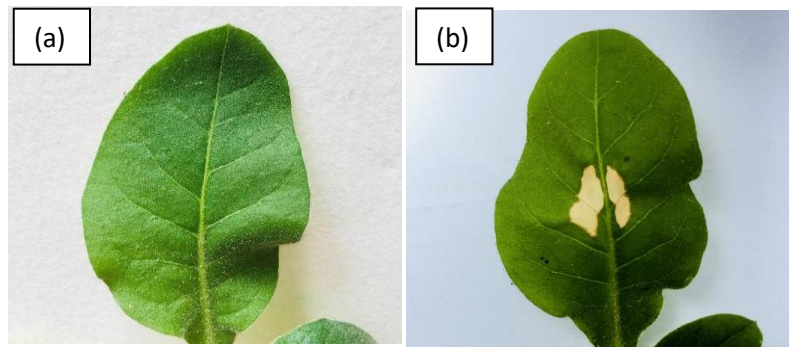
Uji patogenesis yang dilakukan untuk membuktikan isolat bakteri A1 yang telah dimurnikan dapat menyebabkan gejala penyakit dengan ciri yang sama dengan kemunculan gejala serangan penyakit pada *N. gracillis*. Gejala penyakit yang disebabkan isolat bakteri A1 sama berupa bercak dan bintil merah pada daun (Gambar 3).



**Gambar 3.** Uji patogenesis pada daun *N. gracillis* sehat; (a) sebelum diinokulasi suspensi bakteri A1, (b) setelah diinokulasi suspensi bakteri A1

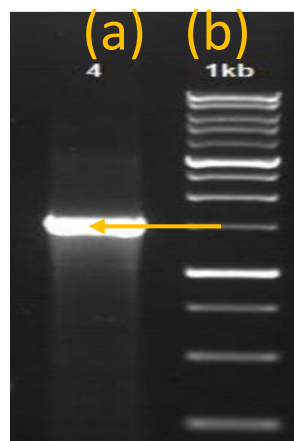
Uji hipersensitif merupakan upaya tanaman dalam mengatasi serangan bakteri yang berpotensi menyebabkan penyakit dengan cara melokalisasi bakteri tersebut (Schaad *et al.*, 2001). Isolat bakteri A1 yang diinfiltrasikan pada daun tembakau menunjukkan adanya gejala nekrosis di

bagian daun yang diinfiltresi bakteri. Hasil tersebut membuktikan isolat bakteri A1 adalah spesifik bakteri patogen yang menyerang dan menyebabkan penyakit pada tanaman.



**Gambar 4.** Uji hipersensitif pada daun tanaman tembakau; (a) sebelum diinfiltresi suspense Bakteri A1, (b) setelah diinfiltresi suspensi bakteri A1

Elektroforesis hasil PCR sekuen gen *16S rRNA* dielektroforesis pada gel agarose 1% menunjukkan adanya pita DNA dari sampel bakteri A1 sejajar pada marker DNA dengan ukuran 900 bp (Gambar 5), adanya pita yang muncul menjadi tanda isolasi DNA berhasil diisolasi.



**Gambar 5.** Elektroforesis hasil PCR gen *16S rRNA* pada gel agarose konsentrasi 1%; (a) pita DNA yang merupakan marker *DNA ladder* 1 kb, (b) pita DNA amplicon isolat bakteri A1 sejajar dengan marker DNA 900 bp

Hasil sekuensing isolat bakteri A1 dengan sekuen gen *16S rRNA* selanjutnya dilakukan BLAST pada *GenBank* NCBI dan didapatkan hasil tiga sekuen acuan dengan similaritas terbesar, yaitu *Erwinia aphidicola* 97,33%, *Erwinia nimipressuralis* 95,43%, dan *Enterobacter roggenkampii* 95,43% (Tabel 2), dari data yang diperoleh maka diketahui hasil sekuensing isoalat bakteri A1 dengan *16S rRNA* mempunyai similaritas yang tinggi dengan bakteri patogen tanaman yaitu *Erwinia aphidicola*.

**Tabel 2.** Hasil analisis similaritas sekuen uji menggunakan metode BLAST NCBI

No	Sampel	Sekuen Acuan ( <i>GenBank</i> )	Similaritas
1.	A1	<i>Erwinia aphidicola</i>	97,33%
2.	A1	<i>Erwinia nimipressuralis</i>	95,43%
3.	A1	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	95,43%

## PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap koloni tunggal bakteri A1 dengan perbesaran mikroskop 100x diketahui bahwa bakteri memiliki bentuk *diplococcus* atau bulat berpasangan, dan pada pengamatan koloni bakteri A1 diketahui bentuk koloni bakteri bulat, dengan tepian koloni rata, berwarna putih krem, dan permukaan koloni cembung. Pewarnaan gram yang dilakukan dengan tujuan mengetahui koloni isolat bakteri A1 yang diperoleh mempunyai ciri bakteri patogen atau tidak, dan didapatkan hasil pewarnaan isolat bakteri A1 merupakan bakteri gram negatif. Kebanyakan bakteri gram negatif memiliki sifat patogen dan merugikan bagi organisme inang. Bakteri gram negatif bersifat patogen



karena memiliki endotoksin pada lapisan selnya, endotoksin merupakan toksin dengan jenis lipopolisakarida (LPS) yang dapat ditemukan di bagian membran luar pada dinding sel. Pada kondisi lingkungan tertentu lipopolisakarida dapat bersifat toksik (Aruwa, 2017).

Uji patogenisitas mendapatkan hasil isolat bakteri A1 mampu menimbulkan gejala yang sama pada *N. gracillis* sehat dengan gejala *N. gracillis* yang terserang penyakit, berupa bintil dan bercak merah pada permukaan daun. Gejala awal ditandai dengan muncul bercak merah yang menyebar ke seluruh permukaan daun, kemudian muncul bintil merah, dan daun coklat mengering karena bintil dan bercak merah mengakibatkan rusaknya jaringan daun (Fanani *et al.*, 2016).

Uji hipersensitif dilakukan pada daun tanaman tembakau karena daun tembakau mampu mengalokasikan serangan bakteri patogen yang menyerang bagian daun sebagai respon ketahanan tanaman tembakau terhadap penyakit (Schaad *et al.*, 2001). Nekrosis daun tanaman tembakau pada uji patogenisitas menunjukkan bahwa isolat bakteri A1 merupakan bakteri patogen pada tanaman.

Hasil sekuensing isolat bakteri A1 yang telah diuji patogenisitas dan uji hipersensitif mendapatkan urutan basa nukleotida sepanjang 900 bp, kemudian dilakukan analisis BLAST pada *GenBank* NCBI, dan didapatkan hasil tiga sekuen acuan memiliki similaritas terbesar dengan urutan basa nukleotida isolat bakteri A1, yaitu *Erwinia aphidicola* sebesar 97,33%, *Erwinia nimipressuralis* sebesar 95,43%, dan *Enterobacter roggenskampii* 95,43%.

Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui isolat bakteri A1 memiliki ciri morfologi dengan bakteri patogen dari genus *Erwinia* yaitu bentuk *diplococcus* berpasangan, gram negatif, warna koloni putih krem, hasil yang sama ditunjukkan dalam penelitian Silalahi *et al.*, (2013), genus *Erwinia* gram negatif, bentuk sel *basil* tunggal atau berpasangan, warna koloni krem, dan tepi koloni rata. Pada penelitian Javandira *et al.*, (2013), bakteri dari genus *Erwinia* mempunyai ciri berupa gram negatif, bentuk sel *basil* tunggal atau berpasangan, warna koloni putih krem. Fanani *et al.*, (2015), melakukan uji patogenisitas bakteri dari genus *Erwinia* pada *N. mirabilis* menemukan gejala penyakit daun berwarna merah kecoklatan, menguning pada tepi daun, kemudian daun mati karena bercak menyebar ke seluruh permukaan daun. Arriani *et al.*, (2020), melakukan penelitian penyakit pada tanaman bawang merah disebabkan bakteri dari genus *Erwinia* dengan gejala daun mengalami layu akibat adanya klorosis dan bercak berwarna kuning, gejala lanjutan daun menjadi kering dan mati.

Pada uji morfologi, uji patogenisitas, dan uji hipersensitif didapatkan kesamaan ciri yang besar antara isolat bakteri A1 dengan bakteri genus *Erwinia*, namun terdapat perbedaan bentuk sel bakteri. Pada umumnya genus *Erwinia* mempunyai bentuk sel *diplobasil* dengan sel yang tidak berpasangan berbentuk *basil*, sedangkan isolat bakteri A1 mempunyai bentuk sel *diplococcus* dengan bentuk sel tunggal *coccus*, hal ini diduga karena adanya sifat bakteri yang statis atau berubah menyesuaikan kondisi lingkungan, sebagai bentuk upaya pertahanan diri bakteri dari kondisi yang ekstrem (Nuroniayah *et al.*, (2012). Data ini diperkuat dengan hasil analisis BLAST pada *GenBank* NCBI, diperoleh sekuensing isolat bakteri A1 memiliki similaritas yang tinggi dengan genus *Erwinia*. Bakteri genus *Erwinia* merupakan bakteri patogen pada tumbuhan dengan cakupan inang yang luas, yaitu pada tanaman sayur, buah, pangan, tanaman hias, dan tanaman obat (Suharjo, 2015).

## SIMPULAN

Isolasi bakteri dari daun tanaman *N. gracillis* yang terjangkit penyakit diperoleh lima isolat bakteri, yaitu A1, A2, A3, A4, dan A5 dengan karakteristik morfologi yang sama dengan bakteri genus *Erwinia*, yaitu bentuk bakteri *diplococcus*, bentuk koloni bulat, tepi koloni rata, warna koloni putih krem, permukaan koloni cembung, dan merupakan bakteri gram negatif. Hasil uji hipersensitif dan uji patogenisitas, diketahui isolat bakteri A1 merupakan bakteri patogen pada tanaman yang menyebabkan penyakit pada daun *N. gracillis*. Hasil sekuensing isolat bakteri A1 menggunakan sekuen gen *16S rRNA* dilakukan analisis BLAST pada *GenBank* NCBI, isolat bakteri A1 mempunyai similaritas yang tinggi dengan bakteri patogen tanaman *Erwinia aphidicola* yaitu 97,33%. Berdasarkan data yang diperoleh, disimpulkan bahwa isolat bakteri A1 yang menyebabkan penyakit bintil dan bercak merah pada daun *N. gracillis* merupakan bakteri patogen tanaman dari genus *Erwinia*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afifah Z, 2017. Uji Antagonis Mikroba Endofit *Trichoderma Sp.* dan *Bacillus cereus* terhadap Patogen *Colletotrichum Capsici* Penyebab Penyakit Antraknosa pada Cabai Rawit (*Capsicum frutescens*). *Doctoral Dissertation*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Arriani IF, Abadi AL dan Aini LQ, 2020. Karakterisasi Bakteri Patogen Penyebab Layu pada Tanaman Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.). *VIABEL: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Pertanian*; 14(1): 69-75.

- Aruwa CE, 2017. *Microbiological Quality Assessment of Pupuru and Plantain Flours in An Urban Market Akure, Ondo State, South Western Nigeria. Open Access Library Journal*; 4(8): 1.
- Barus T, 2019. Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat dari Tapai Singkong berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu Ilmu Hayati*; 2(2): 46-52.
- Fanani AK, Abadi AL dan Aini LQ, 2016. Eksplorasi Bakteri Patogen pada Beberapa Spesies Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes sp.*). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan*; 3(3): 104.
- Fitriani D, 2016. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik pada Cairan Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes sp.*) sebagai Agens Biokontrol. Bogor: Institute Pertanian Bogor.
- Hamzah MZ, 2018. Pengujian Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi secara Molekuler Menggunakan Gen 16s rRNA Bakteri Simbion Endofit yang Diisolasi dari Alga Merah (*Galaxaura rugosa*). *PHARMACON*; 7(3).
- Hidayat Y, 2015. Isolasi Bakteri penghasil Antibiotika dari Cairan Kantong Tumbuhan Kantong Semar (*Nepenthes Sp.*) Cagar Alam Lembah Harau Sumatera Barat.
- Isnaini, Y. 2017. Kultur Jaringan Kantong Semar (*Nepenthes sp.*) di Kebun Raya LIPI dan Pemanfaatannya oleh Masyarakat. *Warta Kebun Raya (Semi-Popular Magazine)*; 13(2): 9-16.
- Javandira C, Aini LQ dan Abadi AL, 2013. Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan*; 1(1): 90.
- Mansur M, 2016. Laju Penyerapan CO<sub>2</sub> pada Kantong Semar (*Nepenthes gymnamphora* Nees) di Taman Nasional Gunung Halimun-Salak, Jawa Barat. *Jurnal Teknologi Lingkungan*; 13(1): 59-65.
- Mardhiana M., Parto Y, Hayati R dan Priadi DP, 2012. Karakteristik dan Kemelimpahan *Nepenthes* di Habitat Miskin Unsur Hara. *Jurnal Lahan Suboptimal: Journal of Suboptimal Lands*; 1(1).
- Nuritasari D, Sarjono PR dan Aminin AL, 2017. Isolasi Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gedong Songo dengan Media Pengaya MB (*Minimal Broth*) dan TS (*Taoge Sukrosa*) serta Identifikasi Fenotip dan Genotip. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*; 20(2): 84-91.
- Nuroniayah T dan Putra SR, 2012. Identifikasi Spesies Isolat Bakteri S1 dengan Metode Analisa Sekuen Fragmen Gen 16s rDNA. *Jurnal Teknik Pomits*; 1(1): 1-6.
- Safira UM., Pasaribu FH. dan Bintang M, 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Current biochemistry*; 1(1): 51-57.
- Schaad NW, Jones JB dan Chun W, 2001. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed.3). *American Phytopathological Society (APS Press)*.
- Shivas R dan Beasley D, 2005. Pengelolaan Koleksi Patogen Tanaman. Departemen Pertanian, Perikanan dan Kehutanan Pemerintah Australia (*Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, DAFF*).
- Silalahi LF, Mukarlina M. dan Rahmawati R, 2013. Karakterisasi dan Identifikasi Genus Bakteri Endofit dari Daun dan Batang Jeruk Siam (*Citrus nobilis var. microcarpa*) Sehat di Desa Anjungan Kalimantan Barat. *Protobiont*; 9(1).
- Suharjo R, 2015. Klasifikasi dan Teknik Identifikasi *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* dan *E. ananas*. Lampung: Universitas Lampung.
- Sunaryanto R. dan Marwoto B, 2012. Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Dadih Susu Kerbau. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*; 14(3): 228-233.
- Suwardi AB dan Navia ZI, 2015. Keanekaragaman Jenis Kantong Semar (*Nepenthes sp.*) di Hutan Rawa Gambut Kalimantan Barat. *Jurnal Jeumpa*; 2(2): 56-63.
- Trisno R, 2012. *Perception of the Inhabitants and Feng Shui Concept for the Balinese Traditional Housing that Adapts Nawa Sanga Space Concept. Karya Ilmiah Dosen*.
- Wahyudi AT, Astuti RP, Widyawati A., Mery A dan Nawangsih AA, 2011. *Characterization of Bacillus sp. Strains Isolated from Rhizosphere of Soybean Plants for Their Use as Potential Plant Growth for Promoting Rhizobacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials*; 3(2): 34-40.

#### Article History:

Received: 30 Juni 2021

Revised: 2 Februari 2022

Available online: 3 Februari 2022

Published: 31 Mei 2022

#### Authors:

Rahmat Agus Prastio, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Ketintang, Kec. Gayungan, Kota SBY, Jawa Timur 60231, Indonesia, e-mail: rahmat.17030244047@mhs.unesa.ac.id  
 Isnawati, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Ketintang, Kec. Gayungan, Kota SBY, Jawa Timur 60231, Indonesia, e-mail: isnawati@unesa.ac.id  
 Dwi Anggorowati Rahayu, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Ketintang, Kec. Gayungan, Kota SBY, Jawa Timur 60231, Indonesia, e-mail: dwirahayu@unesa.ac.id

#### How to cite this article:

Prastio RA, Isnawati, Rahayu DA, 2022. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Patogen pada Tumbuhan Kantong Semar (*Nepenthes gracillis*). *LenteraBio*; 11 (2): 255-262