

**UJI ZONA HAMBAT JAMUR ENDOFIT ASAL TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L.) TERHADAP BAKTERI *Xanthomonas
albilineans* L. SECARA *IN VITRO***

Siti Hardianti Wahyuni¹

¹Dosen Fakultas Pertanian Kampus I Tor Simarsayang Universitas Graha Nusantara
Padangsidempuan

*Corresponding author: sitihardiantiw@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek penghambatan jamur endofit asal tanaman tebu terhadap pertumbuhan bakteri *X. albilineans* secara *invitro*. Penelitian terhadap aktivitas antimikrobal jamur endofit dilakukan dengan metode autoklaf dan membran filter yaitu menggunakan agar difusi cakram. Biakan bakteri dalam cawan petri masing-masing diberikan 3 faktor yaitu jamur endofit (8 jenis jamur endofit), pengenceran (4 kali pengenceran yaitu 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} dan 1×10^{-4} dan sterilisasi (autoklaf dan membran filter). Pertumbuhan *X. albilineans* dihambat secara signifikan oleh jamur endofit pada semua konsentrasi secara signifikan lebih baik.

Kata kunci: Tebu, *Xanthomonas albilineans*, jamur endofit, zona hambat.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of endophytic fungi from sugarcane on the growth of X. albilineans in vitro. Investigation on antibacterial activity of endophytic fungi was performed using autoclave and membran filter method disc agar diffusion test. Growing bacteria in petri dishes were given 3 factor were endophytic fungi (8 endophytic fungi), dilution (4 dilution were 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} and 1×10^{-4} dan sterilisation (autoklaf and membran filter). Growth of X. albilineans in vitro were significantly inhibited by all concentration of endophytic fungi, and its inhibition in all concentrations were significantly more effective.

Keywords : Sugarcane, *Xanthomonas albilineans*, endophytic fungi, inhibitin

PENDAHULUAN

Tebu merupakan bahan baku utama pembuatan gula di Indonesia. Luas areal pertanaman tebu di Indonesia saat ini sesungguhnya hanya berkisar antara 340 – 350 ribu ha/tahun. Sekitar 70% dari areal pertanaman itu merupakan tebu rakyat (Malian *et al.*, 2004). Kebutuhan gula nasional meningkat setiap tahun akibat pertambahan penduduk, perbaikan pendapatan masyarakat, serta perkembangan industri makanan dan minuman. Laju peningkatan konsumsi gula diperkirakan sekitar 3.3 % per tahun (Mardianto *et al.*, 2005). Penurunan produksi gula nasional beberapa tahun terakhir ini disebabkan oleh beberapa hal. Salah satunya karena penyakit. Rata – rata penurunan produksi gula karena serangan penyakit diperkirakan sekitar 10 % (BPPT, 2007). Di antara penyakit tanaman

tersebut, penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas albilineans* L. merupakan penyakit yang sering dijumpai di pertanaman tebu.

Gejala serangan timbulnya klorosis pada daun yang mengikuti alur pembuluh. Jalur klorosis ini lama-lama menjadi kering. Penyakit blendok terlihat kira-kira 6 minggu hingga 2 bulan setelah tanam. Jika daun terserang berat, seluruh daun bergaris-garis hijau dan putih (Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, 2010).

Bakteri ini dapat hidup sebagai saprofit dalam tanah dan menular melalui perantaraan alat yang digunakan untuk memotong stek tebu yang tidak steril serta dengan tertiuip angin dan hujan sehingga harus dilakukan pergiliran tanaman agar mengurangi timbulnya penyakit (Birch, 2001). Penerapan teknik-teknik pengendalian lainnya seperti menanam varietas tahan, solarisasi tanah (Widodo dan Suheri, 1995) dan penggunaan agen hayati diantaranya mikroorganisme antagonis seperti jamur dan bakteri endofit (Azevedo *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2004).

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, dapat diketahui bahwa dalam tanaman terdapat jamur endofit yang memiliki manfaat yang sangat penting bagi tumbuhan. Simbiosis antara jamur endofit dengan tanaman tebu dapat digunakan sebagai antibakteri.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian tempat ± 25 m dpl mulai bulan Januari hingga Mei 2014.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 faktor, antara lain: Jamur Endofit (J) dengan 8 jenis jamur endofit yaitu J1 : *Aspergillus* sp., J2 : *Aspergillus* sp., J3 : (*Penicillium* sp.), J4 : (*Penicillium* sp.), J5 : (*Cephalosporium* sp.), J6 : (*Curvularia* sp.), J7 (*Fusarium* sp.), J8 : (*Hormiscium* sp.), Faktor kedua konsentrasi filtrat kultur media jamur endofit/air steril yaitu 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} dan 1×10^{-4} dan Faktor ketiga metode sterilisasi dengan 2 taraf yaitu : autoklaf (A) dan membran filter (M) menggunakan tiga ulangan.

Pelaksanaan Penelitian

Isolasi bakteri *X. albilineans*

Bagian tanaman tebu yang terserang penyakit vaskular bakteri *X. albilineans* dibersihkan dengan air mengalir, lalu dipotong dengan ukuran 2-3 cm. Setelah itu sampel direndam dengan etanol 70% selama 30 detik, kemudian direndam dengan 0.1% HgCl selama 3 menit dan dibilas dengan air suling steril 2-3 kali (Gagne *et al.* 1987). Selanjutnya sampel digerus dengan mortal steril dan diberikan sedikit air (1ml), lalu tambahkan 9 ml air suling steril untuk pengenceran. Pengenceran dilakukan 10^{-3} - 10^{-5} , kemudian dihomogenkan selama 2 menit. Selanjutnya disebar 0,1 ml di atas media YDCA, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Hung dan Annapurna, 2004).

Pewarnaan Gram Bakteri

Bakteri yang berhasil diisolasi dan telah murni dibiakan dalam media NA. Setelah diinkubasi selama \pm 48 jam kemudian diamati morfologi koloni bakteri tersebut. Biakan murni bakteri yang telah ditanam pada cawan petri diidentifikasi morfologi sel nya dengan pewarnaan gram. Bila bakteri tetap berwarna ungu diakhir pewarnaan, berarti bakteri bersifat Gram-positif, tetapi bila setelah di beri larutan pemucat (alkohol/etanol) berubah warna menjadi merah maka bakteri bersifat Gram-negatif.

Eksplorasi Jamur Endofit dari Tanaman Tebu

Tebu varietas BZ 134 yang akan dijadikan sampel diambil dari beberapa lokasi di PTPN II Sei Semayang. Jamur endofit diperoleh dengan mengisolasi akar, batang, dan daun tanaman tebu yang sehat. Sterilisasi bagian tanaman dilakukan secara bertahap dengan merendam selama 60 detik dalam alkohol 70%, NaOCl 3% selama 60 detik, dan etanol 70% selama 30 detik. Kemudian dibilas sebanyak dua kali dengan aquades steril dan dikeringkan di atas kertas saring steril. Bagian tanaman dibelah untuk ditumbuhkan dalam media PDA. Jamur yang tumbuh dari dalam jaringan tanaman dimurnikan dalam media PDA (Rodrigues, 1994).

Seleksi Jamur Endofit Penghasil *Crude Antibiotik*

Produksi metabolit antimikroba oleh jamur endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam medium PDB. Koloni jamur endofit yang telah diinkubasi pada medium PDA selama 48 jam pada suhu 25°C, diambil 5 *cork bore* dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke medium PDB dalam Erlenmeyer 100 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 25°C dalam *shaker incubator* 130 rpm (Sunarmi, 2010) selama 5-7 hari lalu disaring dengan kertas saring Wattman 041 untuk mendapatkan suspensi antibiotik. Suspensi antibiotik disentrifugasi dengan kecepatan 3800 rpm selama 20 menit. Supernatan dibagi menjadi dua bagian (A dan B) dan diambil untuk sterilisasi dengan cara yaitu sterilisasi autoklaf dan membran filter (Pavithra *et al.*, 2012) :

a. Sterilisasi Autoklaf

Supernatan A dimasukkan ke erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil, disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Hasil tersebut adalah suspensi antibiotik yang digunakan dapat melakukan ekstraksi *crude* antibiotik.

b. Sterilisasi Membran Filter

Supernatan B disterilisasi dengan membran filter ukuran pori 0,45 μ m dan 0,22 μ m sehingga mikroba tertahan dalam pada filter tersebut. Filter ini sebelumnya telah disterilkan dengan autoklaf.. Hasil tersebut adalah suspensi antibiotik yang telah steril digunakan agar dapat melakukan ekstraksi *crude* antibiotik (Abimbola, 2014).

Ekstraksi *Crude Antibiotik*

Suspensi antibiotik diekstraksi dengan pelarut *Chloroform* dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran pelarut dan suspensi antibiotik dihomogenkan sebelum dimasukkan ke dalam corong pemisah, kemudian didinginkan kedalam lemari pendingin selama 4 jam pada suhu 9-10°C untuk optimalisasi pengikatan

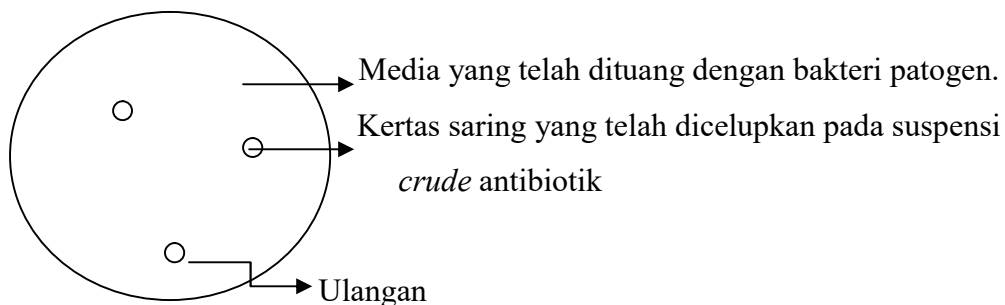
pelarut terhadap antibiotik (Tawiah *et al.*, 2012). Campuran pelarut dan suspensi antibiotik ditampung dalam *beaker glass* (yang telah ditimbang beratnya) dan diuapkan sampai kering di dasar *beaker glass*, endapan ini adalah *crude* antibiotik yang perlu diketahui beratnya dengan cara menimbang kembali berat kotor *beaker glass* untuk menekan berat antibiotik yang diperoleh. Endapan *crude* antibiotik yang didapatkan diencerkan dengan alkohol 96 % dan simpan botol universal sebagai cairan stok (Abimbola, 2014; Anggraini, 2012).

Berat *crude* antibiotik = berat kotor *beaker glass* – berat bersih *beaker glass*.

Pengujian antagonis *crude* antibiotik jamur endofit dengan bakteri patogen

Pengujian dilakukan antara *X. albilnieans* dengan antibiotik jamur endofit yang didapat dalam satu cawan petri yang berdiameter 9 cm. Uji antagonisme dilakukan dengan cara memasukkan koloni dari biakan murni *X. albilnieans* ke dalam media NA kemudian dituang pada satu cawan petri. Uji aktivitas antibakteri isolat jamur terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman dengan cara mengguntingnya dengan alat pembolong kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm (Cappucino dan Sherman, 1996).

Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam di dalam supernatan kultur jamur endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktivitas antimikroba (medium plat NA). Kemudian diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antimikroba ditunjukkan dengan adanya zona jernih. Pertumbuhan jamur diamati setiap hari mulai 1 hari setelah inokulasi (hsi).



Gambar 1. Uji antagonis *crude* antibiotik dengan patogen

Peubah amatan

1. Zona hambat (mm)

Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona bening yang dihasilkan jamur endofit terhadap *X. albilnieans*. Setelah masa inkubasi diameter zona bening di sekitar cakram diukur dengan menggunakan kertas millimeter. Aktifitas ekstrak dapat dilihat dengan adanya zona bening di sekitar cakram. Zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram diukur diameter vertikal dan diameter horizontal dengan satuan milimeter (mm). Diameter zona hambat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Zona hambat} = A - B$$

Keterangan :

A = Diameter zona bening yang terbentuk (mm)

B = Diameter kertas cakram (mm)

(Rante *et. al*, 2013)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diameter zona hambat 1 HSI

Data pengamatan diameter zona hambat pengamatan 1 hari setelah inokulasi (HSI) dan hasil sidik ragamnya dapat dilihat pada lampiran 5. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan jenis jamur endofit, sterilisasi, dan pengenceran berpengaruh nyata terhadap parameter zona hambat pada pengamatan 1 HSI. Perlakuan interaksi antara jenis jamur endofit dengan sterilisasi dan interaksi jamur endofit dengan pengenceran juga menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap parameter zona hambat pada pengamatan 1 HSI, sedangkan interaksi antara sterilisasi dengan pengenceran dan interaksi antara jenis jamur endofit, sterilisasi dan pengenceran belum menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap diameter zona hambat pada pengamatan 1 HSI. Rataan diameter zona hambat pengamatan 1 HSI dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Diameter zona hambat (mm) pada pengamatan 1 HSI

Perlakuan	Jamur								Rataan
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	
Sterilisasi									
A	2,75cd	0,33e	11,13a	1,38de	10,20a	1,13de	0,75e	8,20ab	4,48b
M	4,39c	4,33c	10,58a	3,98c	8,90ab	7,56b	8,35ab	3,22c	6,41a
Pengenceran									
P1	5,33de	3,33f	11,48b	3,18f	14,47a	4,62ef	4,83ef	8,93bc	7,02a
P2	4,17ef	2,67f	11,17b	2,87f	8,83bc	4,33ef	4,53ef	6,08cd	5,58b
P3	2,45f	2,67f	10,58b	2,58f	8,67bc	4,42ef	4,50ef	4,38ef	5,03b
P4	2,33f	0,67g	10,17b	2,08f	6,23cd	4,00ef	4,33ef	3,43ef	4,16b
Interaksi									
AP1	4,67	0,67	11,63	1,50	15,00	1,50	1,00	12,87	6,10
AP2	4,00	0,33	11,33	1,67	10,33	1,00	0,67	8,33	4,71
AP3	1,00	0,33	10,53	1,17	10,00	1,33	0,67	6,27	3,91
AP4	1,33	0,00	11,00	1,17	5,47	0,67	0,67	5,33	3,20
MP1	6,00	6,00	11,33	4,87	13,93	7,73	8,67	5,00	7,94
MP2	4,33	5,00	11,00	4,07	7,33	7,67	8,40	3,83	6,45
MP3	3,90	5,00	10,63	4,00	7,33	7,50	8,33	2,50	6,15
MP4	3,33	1,33	9,33	3,00	7,00	7,33	8,00	1,53	5,11
Rataan	3,57bc	2,33c	10,85a	2,68c	9,55a	4,34b	4,55b	5,71b	

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama pada kelompok perlakuan yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda duncan/DMRT pada $\alpha=5\%$.

- J1 : *Aspergillus* sp., J2 : *Aspergillus* sp., J3 : (*Penicillium* sp.), J4 : (*Penicillium* sp.), J5 : (*Cephalosporium* sp.), J6 : (*Curvularia* sp.), J7 (*Fusarium* sp.), J8 : (*Hormiscium* sp.), P1 : Pengenceran 1×10^{-1} , P2 : Pengenceran 1×10^{-2} , P3 : Pengenceran 1×10^{-3} , P4 : 1×10^{-4} , A : Metode sterilisasi autoklaf, M : Metode sterilisasi membran filter, HSI : Hari Setelah Inokulasi.

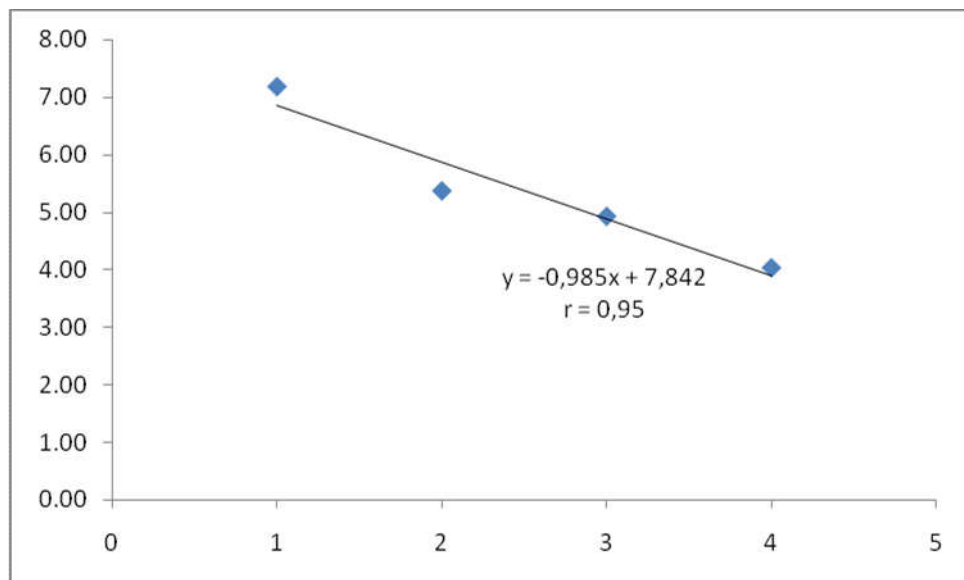
Tabel 1 menunjukkan bahwa pada perlakuan jamur endofit, diameter zona hambat tertinggi terdapat pada jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.) (10,85 mm) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) (9,55 mm) sedangkan yang terendah terdapat pada jamur endofit 2 (*Aspergillus* sp.) (2,33 mm) yang tidak berbeda nyata dengan J1 (3,57 mm). Pada perlakuan metode sterilisasi, secara umum metode sterilisasi dengan membran filter dapat meningkatkan zona hambat jika dibandingkan dengan metode autoklaf. Sedangkan secara spesifik, tidak terdapat perbedaan metode sterilisasi antara autoklaf dengan membran filter pada jenis jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.) dan jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) sedangkan pada jenis jamur lainnya terdapat perbedaan yang nyata. Pada jamur endofit 2 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 6 (*Curvularia* sp.) dan jamur endofit 7 (*Fusarium* sp.) metode sterilisasi terbaik terdapat pada metode membran filter sedangkan pada jenis jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) dan jamur endofit 8 (*Hormiscium* sp.) penggunaan metode sterilisasi terbaik terdapat pada perlakuan autoklaf.

Diameter zona hambat jamur endofit 1 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 2 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 6 (*Curvularia* sp.) dan jamur endofit 7 (*Fusarium* sp.) lebih tinggi menggunakan metode sterilisasi membran filter dibandingkan dengan metode sterilisasi autoklaf. Hal ini berarti jamur tersebut kurang tahan terhadap metode sterilisasi autoklaf. Stefanus (2006) menyebutkan bahwa ada beberapa jamur yang tidak dapat disterilisasi autoklaf karena dapat menyebabkan kerusakan baik secara fisik, perubahan struktur, perubahan aktivitas, penurunan kadar, dan sebagainya. Iman (2014) juga menyatakan bahwa suhu yang tinggi pada sterilisasi autoklaf akan membunuh mikroorganisme, karena sterilisasi menggunakan autoklaf merupakan uap air panas dengan tekanan tinggi yang menyebabkan penetrasi uap air ke dalam sel-sel mikroba menjadi optimal sehingga mematikan mikroba (Sunarmi, 2010). Walaupun diameter zona hambat jamur endofit 1 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 2 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 6 (*Curvularia* sp.) dan jamur endofit 7 (*Fusarium* sp.) lebih tinggi menggunakan metode sterilisasi membran filter dibandingkan dengan autoklaf tetapi pada metode sterilisasi autoklaf tetap menunjukkan hambatan terhadap *X. albilineans*. Namun penggunaan sterilisasi autoklaf ini mampu menyebabkan berkurangnya kadar zat aktif (Lukitaningsih, 2007).

Diameter zona hambat yang terbentuk pada jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) dan jamur endofit 8 (*Hormiscium* sp.) lebih tinggi menggunakan metode sterilisasi autoklaf dibandingkan dengan membran filter. Maria (2002) menyatakan terbentuknya zona hambat menandakan bahwa agens hayati memproduksi suatu senyawa antibiotik yang dapat menghambat atau membunuh organisme lainnya. Sejalan dengan pernyataan Jamila (2011) bahwa adanya zona hambat menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen diduga karena adanya enzim dan senyawa metabolit yang mampu

merusak dinding sel patogen sehingga menyebabkan pertumbuhan bakteri patogen terhambat dan tidak berkembang.

Tabel 1 juga menunjukkan bahwa pengenceran ternyata menurunkan nilai zona hambatan, zona hambatan tertinggi terdapat pada perlakuan P1 (7,02) dan yang terendah terdapat pada perlakuan P4 (4,16). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penurunan ini terjadi secara linier. Grafik penurunan diameter zona hambatan dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 2. Penurunan diameter zona hambatan pada perlakuan pengenceran

Diameter zona hambat 2 HSI

Data pengamatan diameter zona hambat pengamatan 2 hari setelah inokulasi (HSI) dan hasil sidik ragamnya dapat dilihat pada lampiran 8. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan jenis jamur endofit, sterilisasi, dan pengenceran berpengaruh nyata terhadap parameter zona hambat pada pengamatan 2 HSI. Perlakuan interaksi antara jenis jamur dengan sterilisasi dan interaksi jamur dengan pengenceran juga menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap parameter zona hambat pada pengamatan 2 HSI, sedangkan interaksi antara sterilisasi dengan pengenceran dan interaksi antara jenis jamur endofit, sterilisasi dan pengenceran tidak berpengaruh yang nyata terhadap diameter zona hambat pada pengamatan 2 HSI. Rataan diameter zona hambat pengamatan 2 HSI dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada perlakuan jamur endofit, diameter zona hambat tertinggi terdapat pada jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.) (11,35 mm) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) (9,87 mm) sedangkan yang terendah terdapat pada jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.) (2,91 mm) yang tidak berbeda nyata dengan jamur endofit 2 (3,58 mm). Pada perlakuan metode sterilisasi, secara umum metode sterilisasi dengan membran filter dapat meningkatkan zona hambat jika dibandingkan dengan metode autoklaf. Sedangkan secara spesifik, tidak terdapat perbedaan metode sterilisasi antara autoklaf dengan membran filter pada jenis jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.) dan jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) sedangkan pada jenis jamur lainnya

terdapat perbedaan yang nyata. Pada jamur endofit 2 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 6 (*Curvularia* sp.) dan jamur endofit 7 (*Fusarium* sp.) metode sterilisasi terbaik terdapat pada metode membran filter sedangkan pada jenis jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) dan jamur endofit 8 (*Hormiscium* sp.) penggunaan metode sterilisasi terbaik terdapat pada perlakuan autoklaf. Hal tersebut ditunjukkan dengan diameter zona hambat pada Tabel 2.

Menurut Cappucino dan Sherman (1996), faktor-faktor yang mempengaruhi timbulnya zona hambat berupa kemampuan difusi bahan antimikroba ke dalam media dan interaksinya dengan mikroba yang diuji, jumlah mikroba yang diujikan, kecepatan tumbuh mikroba uji, dan tingkat sensitifitas mikroba terhadap bahan antimikroba. Selain itu Demain (1998) menyatakan bahwa ada beberapa dugaan lain mengapa suatu isolat jamur tidak menunjukkan kepekaan senyawa antimikroba, pertama, isolat jamur tersebut memiliki gen untuk mengkode terbentuknya senyawa metabolit namun tidak terekspresi pada keadaan normal sehingga perlu diinduksi oleh senyawa tertentu. Kedua, isolat tersebut menghasilkan senyawa antimikroba namun tidak bersifat aktif terhadap bakteri uji, dan yang ketiga, jamur tersebut menghasilkan senyawa antimikroba intraseluler sehingga senyawa tersebut tidak terekspresi dan terakumulasi di dalam sel (Nofiani *et al.* 2009).

Tabel 2. Diameter zona hambat (mm) pada pengamatan 2 HSI

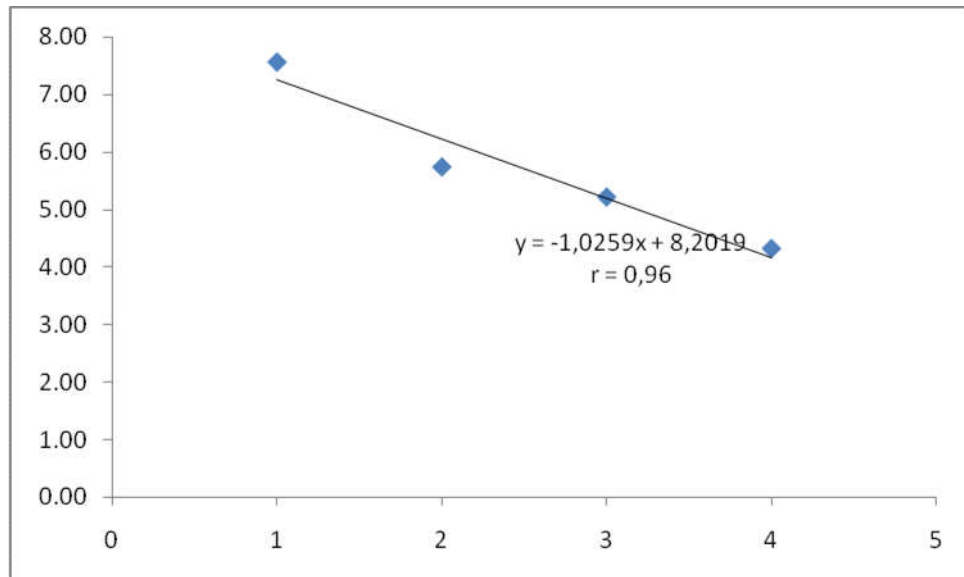
Perlakuan	Jamur								Rataan
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	
Sterilisasi									
A	4,67cd	0,58e	11,55a	1,61e	10,67a	1,27e	1,01e	8,68b	4,94
M	5,95c	6,58c	11,14a	4,21cd	9,08ab	8,03b	8,35b	3,51d	7,07
Pengenceran									
P1	6,83c	4,17cd	11,98b	3,53cd	14,82a	5,12c	4,97cd	9,38bc	7,54
P2	6,50c	4,33cd	11,72b	3,07d	9,23b	4,67cd	4,70cd	6,43c	6,29
P3	4,40cd	3,67cd	11,22b	2,73d	8,93bc	4,65cd	4,63cd	4,72cd	5,58
P4	3,50cd	2,17d	10,47b	2,30d	6,50	4,17cd	4,42cd	3,83cd	4,62
Interaksi									
AP1	6,33	1,00	12,23	1,87	15,57	1,67	1,27	13,47	6,60
AP2	6,33	0,67	12,13	1,80	10,70	1,20	1,00	8,73	5,27
AP3	3,00	0,67	11,43	1,40	10,40	1,53	0,93	6,73	4,45
AP4	3,00	0,00	10,40	1,37	6,00	0,67	0,83	5,77	3,45
MP1	7,33	7,33	11,73	5,20	14,07	8,57	8,67	5,30	8,49
MP2	6,67	8,00	11,30	4,33	7,77	8,13	8,40	4,13	7,30
MP3	5,80	6,67	11,00	4,07	7,47	7,77	8,33	2,70	6,70
MP4	4,00	4,33	10,53	3,23	7,00	7,67	8,00	1,90	5,79
Rataan	5,31b	3,58bc	11,35a	2,91c	9,87a	4,65b	4,68b	6,09b	

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama pada kelompok perlakuan yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda duncan/DMRT pada $\alpha=5\%$.

- J1 : *Aspergillus* sp., J2 : *Aspergillus* sp., J3 : (*Penicillium* sp.), J4 : (*Penicillium* sp.), J5 : (*Cephalosporium* sp.), J6 : (*Curvularia* sp.), J7 (*Fusarium* sp.), J8 : (*Hormiscium* sp.), P1 : Pengenceran 1×10^{-1} , P2 : Pengenceran 1×10^{-2} , P3 :

Pengenceran 1×10^{-3} , P4 : 1×10^{-4} , A : Metode sterilisasi autoklaf, M : Metode sterilisasi membran filter, HSI : Hari Setelah Inokulasi.

Tabel 2 juga menunjukkan bahwa pengenceran ternyata menurunkan nilai zona hambatan, zona hambatan tertinggi terdapat pada perlakuan P1 (7,54) dan yang terendah terdapat pada perlakuan P4 (4,62). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penurunan ini terjadi secara linier. Grafik penurunan diameter zona hambatan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Penurunan diameter zona hambat pada perlakuan pengenceran

Diameter zona hambat 3 HSI

Data pengamatan diameter zona hambat pengamatan 3 hari setelah inokulasi (HSI) dan hasil sidik ragamnya dapat dilihat pada lampiran 11. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan jenis jamur endofit, sterilisasi, dan pengenceran berpengaruh nyata terhadap parameter zona hambat pada pengamatan 3 HSI. Perlakuan interaksi antara jenis jamur dengan sterilisasi dan interaksi jamur dengan pengenceran juga menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap parameter zona hambat pada pengamatan 3 HSI, sedangkan interaksi antara sterilisasi dengan pengenceran dan interaksi antara jenis jamur endofit, sterilisasi dan pengenceran tidak berpengaruh yang nyata terhadap diameter zona hambat pada pengamatan 3 HSI. Rataan diameter zona hambat pengamatan 3 HSI dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada perlakuan jamur endofit, diameter zona hambat tertinggi terdapat pada jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.) (11,43 mm) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) (10,12 mm) dan jamur endofit 8 (*Hormiscium* sp.) (6,52 mm) sedangkan yang terendah terdapat pada jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.) (3,16 mm) yang tidak berbeda nyata dengan jamur endofit 2 (4,40 mm). Pada perlakuan metode sterilisasi, secara umum metode sterilisasi dengan membran filter dapat meningkatkan zona hambat jika dibandingkan dengan metode autoklaf. Sedangkan secara spesifik, tidak terdapat perbedaan metode sterilisasi antara autoklaf dengan membran filter pada jenis jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.) dan jamur endofit 5

(*Cephalosporium* sp.) sedangkan pada jenis jamur lainnya terdapat perbedaan yang nyata. Pada jamur endofit 2 (*Aspergillus* sp.), jamur endofit 4 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 6 (*Curvularia* sp.) dan jamur endofit 7 (*Fusarium* sp.) metode sterilisasi terbaik terdapat pada metode membran filter sedangkan pada jenis jamur endofit 3 (*Penicillium* sp.), jamur endofit 5 (*Cephalosporium* sp.) dan jamur endofit 8 (*Hormiscium* sp.) penggunaan metode sterilisasi terbaik terdapat pada perlakuan autoklaf yang ditunjukkan dengan diameter zona hambat pada Tabel 3. Hal ini karena pada jamur endofit terdapat suatu senyawa antibiotik yang dapat menghambat atau membunuh organisme lainnya. Menurut suatu penelitian yang dilakukan oleh Bell (1984), suatu bahan dikatakan mempunyai aktivitas antibakteri apabila diameter hambatan yang terbentuk lebih besar atau sama dengan 6 mm. Lebarnya diameter zona hambat dapat dijadikan sebagai parameter untuk melihat kekuatan senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak jamur endofit. Semakin luas diameter zona hambat yang terbentuk mengindikasikan semakin kuatnya senyawa bioaktif itu menghambat pertumbuhan bakteri. Ekstrak yang menunjukkan zona hambat yang kecil bukan berarti sampel tersebut kurang aktif, tetapi kemungkinan tidak terdeteksi pada konsentrasi sampel uji yang digunakan atau kadar hambat umumnya belum tercapai.

Tabel 3. Diameter zona hambat (mm) pada pengamatan 3 HSI

Perlakuan	Jamur								Rataan
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	
Sterilisasi									
A	5,03c	0,67e	11,82a	1,74e	10,88a	1,43e	1,17e	9,04ab	5,22
M	6,40c	8,13b	11,03a	4,58cd	9,36a	8,41b	9,30a	3,99d	7,65
Pengenceran									
P1	7,32d	5,50e	12,07b	3,88f	15,08a	5,43e	5,67e	9,80c	8,09
P2	6,95de	5,42e	11,88b	3,43f	9,50c	4,93e	5,28e	6,80de	6,78
P3	4,72e	4,33e	11,30b	2,87f	9,18cd	4,93e	5,15e	5,23e	5,96
P4	3,87f	2,33	10,45bc	2,45f	6,70de	4,37e	4,83e	4,23ef	4,90
Interaksi									
AP1	6,77	1,00	12,67	2,03	15,80	1,90	1,43	13,87	6,93
AP2	6,73	1,00	12,50	1,93	10,87	1,50	1,17	9,03	5,59
AP3	3,30	0,67	11,53	1,50	10,70	1,63	1,07	7,13	4,69
AP4	3,30	0,00	10,57	1,50	6,13	0,67	1,00	6,13	3,66
MP1	7,87	10,00	11,47	5,73	14,37	8,97	9,90	5,73	9,25
MP2	7,17	9,83	11,27	4,93	8,13	8,37	9,40	4,57	7,96
MP3	6,13	8,00	11,07	4,23	7,67	8,23	9,23	3,33	7,24
MP4	4,43	4,67	10,33	3,40	7,27	8,07	8,67	2,33	6,15
Rataan	5,71b	4,40bc	11,43a	3,16c	10,12a	4,92b	5,23b	6,52b	

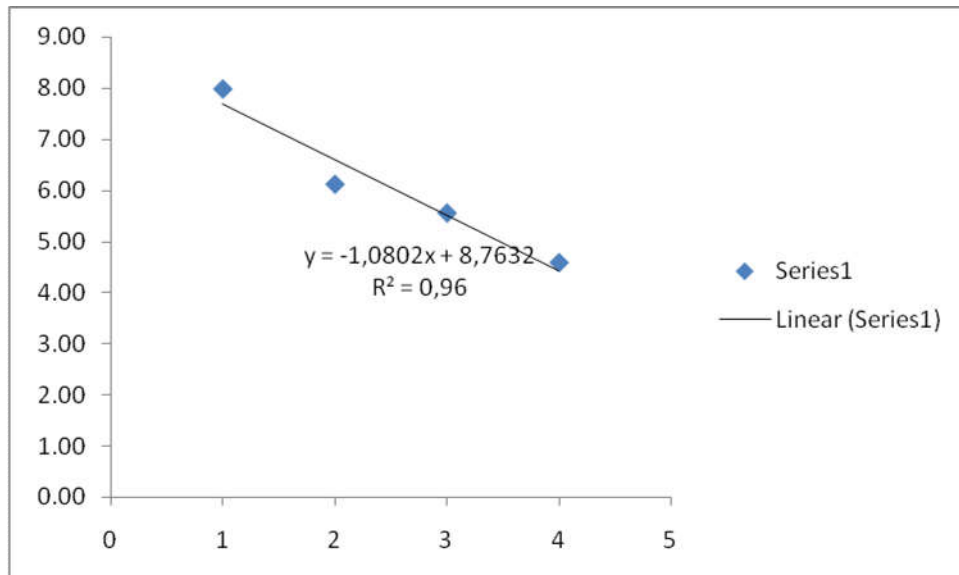
Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama pada kelompok perlakuan yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda duncan/DMRT pada $\alpha=5\%$.

- J1 : *Aspergillus* sp., J2 : *Aspergillus* sp., J3 : (*Penicillium* sp.), J4 : (*Penicillium* sp.), J5 : (*Cephalosporium* sp.), J6 : (*Curvularia* sp.), J7 (*Fusarium* sp.), J8 : (*Hormiscium* sp.), P1 : Pengenceran 1×10^{-1} , P2 : Pengenceran 1×10^{-2} , P3 :

Pengenceran 1×10^{-3} , P4 : 1×10^{-4} , A : Metode sterilisasi autoklaf, M : Metode sterilisasi membran filter, HSI : Hari Setelah Inokulasi.

Hambatan yang dihasilkan oleh ekstrak terhadap mikroba uji kemungkinan disebabkan karena ekstrak tersebut memiliki aktifitas antimikroba yang bisa saja menyebabkan perusakan sel dengan cara menghambat pembentukan dinding dan membran sel yang dapat mengganggu permeabilitas sel atau mungkin menghambat sintesis protein dan asam nukleat sehingga sel tidak dapat lagi melangsungkan hidupnya karena proses utama dalam hidupnya sudah dirusak oleh ekstrak tersebut (Ruzin *et al.*, 2003; Berdy 2005). Keberadaan antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri lebih melemahkan dinding sel bakteri Gram negatif karena terjadi penghambatan sintesis peptidoglikan yang terdapat banyak pada bakteri gram negatif (Veronica, 2008). Getha dan Vikineswary (2002) menyatakan secara umum mekanisme yang dilalui mikroba dalam menghambat bakteri patogen di rizosfer antara lain melalui persaingan terhadap nutrisi, oksigen, atau ruang, parasitisme atau perusakan dinding sel jamur oleh enzim hidrolitik yang dihasilkan oleh antagonistik, antibiosis atau penghambatan terhadap suatu mikroba melalui produksi senyawa tertentu oleh mikroba lain dan atau melalui kombinasi sinergis dari mekanisme tersebut.

Tabel 3 juga menunjukkan bahwa pengenceran ternyata menurunkan nilai zona hambatan, zona hambatan tertinggi terdapat pada perlakuan P1 (8,09) dan yang terendah terdapat pada perlakuan P4 (4,90). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penurunan ini terjadi secara linier. Grafik penurunan diameter zona hambatan dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Penurunan diameter zona hambat pada perlakuan pengenceran

Selanjutnya ke-8 isolat jamur ini dilakukan penapisan secara *in-vitro* untuk melihat kemampuannya sebagai agens hayati. Hasil penapisan diperoleh 3 isolat jamur yang mempunyai kemampuan cukup baik dalam menghambat *X. albilineans* secara *in-vitro* digunakan untuk penelitian lanjutan di rumah kaca.

KESIMPULAN

Perlakuan jenis jamur endofit, sterilisasi, pengenceran, interaksi antara jenis jamur dengan sterilisasi dan interaksi jamur dengan pengenceran berpengaruh nyata terhadap parameter zona hambat, sedangkan interaksi antara sterilisasi dengan pengenceran dan interaksi antara jenis jamur endofit, sterilisasi dan pengenceran tidak pengaruh yang nyata terhadap diameter zona hambat pada pengamatan 3 HSI. Hasil penapisan dari 8 isolat jamur endofit diperoleh 3 isolat jamur yang mempunyai kemampuan cukup baik dalam menghambat *X. albilineans* secara *in-vitro*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut penggunaan antibiotik jamur endofit dengan menaikkan dosis untuk meningkatkan ketahanan tanaman tebu terhadap penyakit layu vaskular bakteri pada kondisi lapang dan meneliti lebih lanjut kandungan yang terdapat dalam antibiotic

DAFTAR PUSTAKA

- Abimbola, I.O. 2014. The effect of autoclaving and membrane filtration on the antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *Microbiol.* 4(1):6–9.
- Azevedo, J.L.W., Maccheroni J.R., Pereira, J.O. and Luiz, A.W. 2000. Endophytic microorganism: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Biotech.* 3(1):40-65.
- BPPT. 2007. Melihat Industri Gula Indonesia Dari Waktu ke Waktu. Diakses dari http://lc.bppt.go.id/iptek/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=44. Diunduh pada tanggal 15 Mei 2013.
- Bell, S.M. 1984. Antibiotic Sensitivity Testing by The CDS Method, New South Wales. Clinical Microbiology Update Programme. Ed. N. Heriwig. The Prince Wales Hospital.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. Review Article. *J Antibiot.* 58(1):1–26.
- Birch, R.G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Molec.Plant.Pathol.* 2(1):10-11.
- Cappucino, S.M and Sherman, N. 1996. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 4th Ed. Addison-Wesley Publishing Company.
- Getha K, Vikineswary S. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiotics in the antagonistic process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28:303–310.

- Lukitaningsih, E, dkk. 2007. Pengaruh Suhu Sterilisasi terhadap Penyerapan Larutan D-Manitol Sediaan Parenteral dengan Pengemas Plastik Low Density Polyethylene. *J. Farm Indo.* 3(3):144–148.
- Malian, A.H., M. Ariani, K.S. Indraningsih, A.K. Zakaria, A. Askin dan J. Hestina. 2004. *Revitalisasi Sistem dan Usaha Agribisnis Gula; Laporan Akhir*. Puslitbang Sosial Ekonomi Pertanian, Bogor.
- Mardianto, S., Simatupang, P., Hadi, P.U., Malian, H., Susmiadi, A. 2005. Peta jalan (road map) dan kebijakan pengembangan gula nasional. *Forum penelitian Agro Ekonomi* 23 (1): 19-37.
- Nofiani, R., Nurbetty, S., dan Sapar, A. 2009. Aktivitas antimikroba ekstrak metanol bakteri berasosiasi dengan spons dari Pulau Lemukutan Kalimantan Barat. *J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis.* 1(2):33-41.
- Pavithra, N., Sathish, L., and Ananda, K., 2012. Antimicrobial and Enzyme Activity of Endophytic Fungi Isolated from Tulsi. *J. Pharmaceutical Biomedical Sci.* 6(12):1-6.
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Gula Indonesia (P3GI). 2007. *Studi Konsolidasi Pergulaan Nasional*. Kerjasama Ditjen BPP Deptan dengan P3GI, Jakarta.
- Rante, H., Burhanuddin T., dan Soendaria, I. 2013. Isolasi Fungi Endofit Penghasil Senyawa antimikroba dari Daun Cabai Katokkon (*Capsicum annum* L var. chinensis) dan Profil KLT Bioautografi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi.* 17(2):39-49
- Rodrigues KF. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm. *Euterpe oleracea. Mycologia* 86: 376-385.
- Ruzin A, Singh G, Severin A, Yang Y, Dushin RG, Sutherland AG, Minnick A, Greenstein M, May MK, Shlaes DM, Bradford PA. 2004. Mechanism of action on the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptides antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:728–738.
- Stefanus, L. 2006. *Formulasi Steril*. Indonesia.
- Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 67(4):491-502.
- Widodo and Suheri. 2000. Suppression of clubroot disease of cabbage by soil solarisation. *Bul HPT.* 8(2):49-55.