

## ISOLASI BAKTERI INTI ES PADA KENTANG

### (ISOLATION OF ICE NUCLEATION-ACTIVE BACTERIA ON POTATO)

Triwidodo Arwiyanto

Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRACT

*Frost injury is one of the limiting factors in potato production in Dieng (2000 m above sea level), Central Java. The damage caused by frost has been recorded since long time ago, however, there is no studies about this matter. The objective of the present study is to isolate ice nucleation active bacteria which reside epiphytically at the surface of potato leaves. Potato and several crop leaves were collected and the ice catalyst was detected from leaf-washings. The bacteria were isolated on Nutrien Agar and Nutrien Agar Glycerol medium. The results indicated that ice catalyst was detected from the leaf washing of potato (*Solanum tuberosum* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.) but not from others. The ice catalyst was not detected from the extract of surface soil, neither. The ice nucleation active bacteria were successfully isolated from potato leaf and were identical to *Erwinia ananas* in their bacteriological properties.*

*Key words : Ice Nucleating-Active Bacteria, potato, frost*

#### INTISARI

Embun upas adalah lapisan tipis es yang menyelimuti permukaan tanaman. Embun upas ('frost') merupakan salah satu faktor pembatas pada produksi kentang di Dieng. Bencana tersebut sudah sejak lama muncul tetapi sampai saat sekarang belum ada tindakan pencegahan sehingga kerugian yang diderita petani sangat besar. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi bakteri inti es pada permukaan daun kentang yang dapat bertindak sebagai pemicu timbulnya embun upas pada kentang. Daun beberapa tanaman, termasuk kentang yang diambil dari Dieng kemudian air cucuannya dideteksi adanya katalisator terbentuknya es. Dari air cucian daun kentang juga dilakukan isolasi bakteri pada medium NA dan NAG. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada beberapa tanaman lain dan juga pada tanah pertanian tidak ditemukan adanya katalisator tersebut. Isolasi bakteri yang dilakukan dari air cucian daun kentang menunjukkan bahwa bakteri termasuk ke dalam marga *Erwinia*. Dari beberapa sifat bakteriologi yang diperoleh dapat disimpulkan untuk sementara bahwa bakteri tersebut termasuk ke dalam jenis *Erwinia ananas*.

Kata kunci : bakteri inti es, kentang, embun upas

#### PENGANTAR

Salah satu kendala dalam produksi kentang, khususnya di daerah Dieng (2000 m di atas permukaan laut) Jawa Tengah, adalah adanya embun upas pada musim kemarau. Pada tahun 1994 tercatat kurang lebih 35 ha pertanaman kentang di Dieng terkena embun upas dengan nilai kerugian mencapai ratusan juta rupiah. Gejala pada tanaman yang terkena embun upas mirip dengan gejala *frost injury* pada berbagai tanaman yang dilaporkan di beberapa negara. Di Jepang, *frost injury* dijumpai pada brokoli, kubis, murbei (Goto *et al.*, 1989) dan teh (Goto *et al.*, 1988). Di Amerika Serikat, kerusakan karena 'frost injury' dilaporkan pada jagung (Lindow *et al.*, 1978), jeruk, tomat, gandum dan juga beberapa tanaman keras (Lindow, 1983). Di

kedua negara tersebut dibuktikan bahwa embun upas yang muncul ternyata dikatalisir oleh bakteri epifit yang hidup di permukaan daun (Goto *et al.*, 1988; Lindow, 1983).

Selain di Dieng, embun upas yang juga disebut sebagai embun beku atau embun bajera dilaporkan terjadi di kebun-kebun teh Patuha dan Pangalengan pada ketinggian 1500 - 2300 m (Semangun, 1979). Bahkan pada ketinggian 1300 m embun beku dilaporkan terjadi pada kebun teh di Gambung pada tahun 1994 (Semangun, 1996). Meskipun demikian belum ada penelitian lanjutan tentang embun upas pada teh tersebut.

Bakteri yang mampu mengkatalisir terbentuknya kristal es disebut sebagai bakteri inti es (Ice Nucleation Active Bacteria). Sampai saat sekarang ada beberapa spesies bakteri yang dilaporkan dapat bertindak sebagai inti es yaitu

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. viridiflava*, *P. fluorescens*, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, *Erwinia herbicola* (Lindow, 1983) dan *Erwinia ananas* (Goto et al., 1989).

Tulisan ini melaporkan bahwa pada permukaan daun kentang berhasil dideteksi adanya katalisator terbentuknya es berupa bakteri Gram negatif. Bakteri tersebut mempunyai banyak kemiripan sifat bakteriologi dengan *E. ananas*.

## BAHAN DAN METODE

### 1. Deteksi katalisator terbentuknya kristal es pada permukaan daun

Sampel daun beberapa tanaman dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml akuades steril. Setelah digojog kuat dengan vortex selama lima menit kemudian air cucian dituang ke tabung reaksi steril secara aseptis. Tabung reaksi yang berisi air cucian daun tersebut segera diinkubasikan pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$  selama satu jam. Sebagai kontrol, pada tabung reaksi yang lain diisi akuades steril. Setelah masa inkubasi diamati adanya kristal es yang terbentuk pada tabung reaksi.

### 2. Isolasi bakteri inti es

Dua puluh gram daun kentang dipotong kecil-kecil dan disuspensikan ke dalam 180 ml 0,1 M bufer fosfat pH 7,0 yang ditambah 0,1% pepton. Suspensi digojog kuat selama dua jam. Air cucian yang diperoleh diencerkan per sepuluh kali dengan bufer yang sama. Pada pengenceran  $10^{-5}$ , suspensi diambil 0,1 ml dan ditumbuhkan pada medium agar nutrisi + 2,5% gliserol (NAG). Inkubasi dilakukan pada suhu  $23^{\circ}\text{C}$  selama empat hari.

### 3. Deteksi koloni bakteri inti es

Metode yang dikembangkan oleh Lindow (1978) dimodifikasi untuk mendeteksi koloni bakteri inti es sebagai berikut. Lembaran aluminium foil disemprot satu sisinya dengan 0,1% parafin cair dalam xilol. Setelah xilol diuapkan pada suhu  $55^{\circ}\text{C}$ , pada sisi-sisinya dilipat sehingga membentuk kotak dengan dinding yang rendah. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium NAG dipindah secara aseptis ke medium agar nutrisi dan ke permukaan aluminium foil

dengan tusuk gigi steril. Satu kotak aluminium foil dapat digunakan untuk menampung 20 koloni. Kotak aluminium berisi koloni segera diambangkan pada permukaan metanol suhu  $-10^{\circ}\text{C}$ . Akuades steril disemprotkan pada permukaan aluminium foil. Setelah dua menit diamati adanya kristal es pada tetes air yang jatuh pada koloni bakteri. Koloni bakteri yang mengkatalisir terbentuknya kristal es ditandai pada padanannya di medium agar nutrisi untuk kemudian dimurnikan dan disimpan.

### 4. Identifikasi bakteri

Bakteri inti es yang berhasil diisolasi kemudian diidentifikasi berdasarkan metoda baku (Bradbury, 1987; Hayward, 1990; Sands, 1990; Krieg and Holt, 1984).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Deteksi katalisator terbentuknya kristal es pada permukaan daun

Dari beberapa tanaman yang diamati, ditemukan katalisator terbentuknya kristal es pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$ . Kristal es terbentuk pada tabung reaksi yang berisi air cucian daun kentang dan daun kacang babi (*Vicia faba* L.). Air cucian dari daun tanaman lain serta ekstrak tanah dan kontrol (akuades steril) tidak menunjukkan adanya kristal es (Tabel 1).

Tabel 1. Pembentukan kristal es pada tabung reaksi yang berisi air cucian daun  
Table 1. Ice crystal formation in the test tube containing leave washing

No.	Jenis air cucian	Kristal es
No.	Kind of leave washing	Ice crystal
1.	Kontrol (Akuades steril)	-
2.	Daun kentang (leave of potato) ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	+
3.	Daun kacang babi (leave of broad bean) ( <i>Vicia faba</i> L.)	+
4.	Daun kubis (leave of cabbage) ( <i>Brassica oleracea</i> L.)	-
5.	Daun bawang putih (leave of garlic) ( <i>Allium sativum</i> L.)	-
6.	Ekstrak tanah (soil extract)	-

Keterangan : + = terbentuk kristal es  
(ice crystal formed)  
(Note) - = tidak terbentuk kristal es  
(no ice crystal formed)

Tidak terbentuknya kristal es pada air cucian tanaman selain kentang dan kacang babi ini bukan berarti tidak adanya katalisator. Mungkin katalisator tersebut ada tetapi dalam jumlah yang sangat sedikit sehingga tidak terdeteksi dengan metode yang digunakan dalam penelitian ini. Di samping itu, tidak terjadinya kristal es pada tabung rekasi yang berisi ekstrak tanah menunjukkan bahwa kristal es yang terbentuk pada air cucian daun kentang dan daun kacang babi dikatalisir oleh faktor lain selain debu. Dilaporkan bahwa debu dapat bertindak sebagai katalisator terbentuknya es pada suhu di bawah  $-10^{\circ}\text{C}$  sampai  $-15^{\circ}\text{C}$  (Lindow, 1983). Kemungkinan besar terbentuknya kristal es ini dikatalisir oleh bakteri epifit yang hidup pada permukaan daun kedua tanaman tersebut.

## 2. Isolasi bakteri inti es dan deteksi koloni bakteri inti es

Pengambilan sampel daun kentang dilakukan dari bulan Juli 1995 sampai Januari 1996. Pada setiap isolasi dari sampel tersebut tidak selalu dijumpai adanya bakteri inti es. Populasi bakteri epifit pada daun kentang berkisar dari  $3 \times 10^7$  sampai  $6 \times 10^7$  unit koloni/gram berat basah daun. Bakteri inti es yang berhasil diisolasi sebanyak 13 isolat. Ke tiga belas isolat bakteri tersebut mampu membentuk kristal es pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$  dalam waktu dua menit. Isolat bakteri lainnya yang berhasil diisolasi ternyata tidak mampu membentuk kristal es. Rendahnya angka jumlah bakteri inti es yang berhasil diisolasi dikarenakan penggunaan medium yang tidak selektif. Penelitian ini baru pada tahap isolasi dan deteksi bakteri yang mampu bertindak sebagai inti es. Setelah diketahui jenis bakteri tersebut maka baru dapat digunakan medium selektif untuk studi selanjutnya seperti dinamika populasi serta studi ekologi lainnya. Medium selektif yang digunakan dapat mengacu pada pustaka yang ada atau dapat dirancang sendiri berdasarkan jenis bakteri tersebut.

## 3. Identifikasi bakteri inti es

Semua isolat bakteri inti es menunjukkan koloni berbentuk bulat, tepi rata dan tembus cahaya. Koloni berwarna kuning dan beberapa isolat berwarna putih. Setelah inkubasi pada suhu  $23^{\circ}\text{C}$  selama empat hari ukuran koloni berkisar 2-4 mm. Dari beberapa sifat bakteriologi yang diuji, bakteri inti es yang berhasil diisolasi

semuanya memiliki banyak kemiripan dengan *Erwinia ananas* seperti yang dideskripsikan oleh Goto *et al.*, 1989 (Tabel 2).

Tabel 2. Sifat-sifat bakteriologi bakteri inti es dari permukaan daun kentang  
Table 2. Bacteriological properties of ice nucleation active bacteria isolated from potato leave surface

Karakteristik Properties	Isolat kentang Present	<i>Erwinia ananas</i> (Goto <i>et al.</i> , 1989) isolates
Oksidase ( <i>oxydase</i> )	-	-
Katalase ( <i>catalase</i> )	+	+
Gram ( <i>gram</i> )	-	-
Hidrolisa ( <i>hydrolisis of</i> ):		
pati ( <i>strach</i> )	-	+/-
gelatin ( <i>gelatin</i> )	-	+
eskulin ( <i>esculin</i> )	+	V
Tween 80	-	V
Pembentukan Levan ( <i>levan formation</i> )	-	-
Reduksi nitrat ( <i>nitrat reduction</i> )	-	-
Arginin dihidrolase	-	-
Pigmen fluoresen ( <i>fluorescen pigment</i> )	-	-
Oksidatif-fermentatif ( <i>OF</i> )	F	F
Produksi ( <i>production of</i> ):		
acetoin	+	+
indol ( <i>indole</i> )	+	+
Penggunaan sumber karbon: ( <i>utilization of carbon source</i> )		
glukosa ( <i>glucose</i> )	+	+
sukrosa ( <i>sucrose</i> )	+	+
selobiosa ( <i>sellobiose</i> )	+	+
trehalosa ( <i>trehalose</i> )	+	+
arabinosa ( <i>arabinose</i> )	+	TD

Keterangan :

+ = 80% atau lebih bersifat positif  
(80% or more are positive)

- = 80% atau lebih bersifat negatif  
(80% or more are negative)

V = hasil bervariasi (*vary*)

F = fermentatif (*fermentative*)

TD= tidak dideterminasi (*not determined*)

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana Penunjang Pendidikan UGM dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian No. UGM/3245/M/09/01 tanggal 1 Juni 1995. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala Dinas Pertanian Kabupaten Wonosobo yang telah memberi ijin untuk pengambilan sampel di daerahnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bradbury, J.F. 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CMI. 332pp.
- Goto, K.; T. Inaba and M. Goto. 1988. Factors affecting frost damage of vegetable crops by artificial spraying of ice nucleation-active bacteria in a freezing chamber. *Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku* 23: 47-55. In Japanese
- Goto, M.; T. Goto and T. Inaba. 1989. Identification of Ice Nucleation-Active Bacteria Isolated from Frost Damaged Vegetable Leaves. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:330-335
- Hayward, A.C. 1990. Proposals for a Quick Practical Identification. In: Klement, Z.; K. Rudolph and D.C. Sands (eds.) *Methods in Phytobacteriology*. p 269-274. Akademiai Kiado. Budapest.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. William and Wilkins. Baltimore. 964 pp.
- Lindow, S.E. 1983. The Role of Bacterial Ice Nucleation in Frost Injury to Plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21: 363-384
- Lindow, S.E.; Army, D.C. and Upper, C.D. 1978. Distribution of Ice Nucleation-Active Bacteria on Plants in Nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 831-838
- Sands, D.C. 1990. Physiological Criteria-Determinative Tests. In: Klement, Z.; K. Rudolph and D.C. Sands (eds.) *Methods in Phytobacteriology*. p 134-152. Akademiai Kiado. Budapest.
- Semangun, H. 1996. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. 754 pp.
- Semangun, H. 1979. *Penyakit Tumbuhan, Hubungannya dengan Iklim dan Cuaca*. Simposium Meteorologi Pertanian, Bogor, 5-8 Maret 1979. Tidak dipublikasikan.