

Karakterisasi Potensi *Bacillus altitudinis* P-10 sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)

Faza Laili Husna¹⁾, Anto Budiharjo¹⁾ dan Susiana Purwantisari¹⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika
Universitas Diponegoro Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang,
Indonesia E-mail: anto.budiharjo@fullbrightmail.org

ABSTRAK

Plant Growth Promoting Rhizobacteri (PGPR) memiliki kemampuan untuk meningkatkan pertumbuhan serta meningkatkan ketahanan terhadap hama dan penyakit pada tanaman. *Bacillus altitudinis* P-10 dari rhizosfer tanaman padi persawahan organik di Kecamatan Banyubiru, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah memiliki potensi sebagai PGPR yang memiliki kemampuan menghambat fitopatogen *Xanthomonas oryzae* dan *Xanthomonas campestris*, serta diprediksi memiliki gen untuk produksi antibiotik peptida non ribosomal. Karakterisasi *B. altitudinis* P-10 dilakukan untuk mengetahui potensinya sebagai PGPR melalui uji kualitatif yang meliputi aktivitas kitinolitik dan selulolitik, produksi IAA (*Indole Acetic Acid*), produksi HCN (Hidrogen Sianida), kemampuan melarutkan fosfat dan produksi senyawa antibiotik. Hasil uji kualitatif menunjukkan *B. altitudinis* P-10 memiliki aktivitas selulolitik, kemampuan menghasilkan IAA dan kemampuan melarutkan fosfat serta produksi senyawa antibiotik dari golongan peptida non ribosomal yaitu *bacitracin*, *gramicidin*, *surfactin*, *fengycin* dan *bacillomycin D*. *Bacillus altitudinis* P-10 memiliki karakteristik sebagai PGPR melalui kemampuannya dalam memproduksi IAA, melarutkan fosfat, aktivitas selulolitik dan produksi antibiotik. Hal tersebut menunjukkan potensi *B. altitudinis* P-10 sebagai PGPR.

kata kunci : *B. altitudinis* P-10, PGPR

ABSTRACT

Plant Growth Promoting Rhizobacteri (PGPR) has the ability to promote growth and increase resistance to pests and diseases in plants. *Bacillus altitudinis* P-10 from rice plant rhizosphere in Banyubiru Subdistrict, Semarang regency, Central Java has potential as PGPR that has the ability to inhibit phytopathogen *Xanthomonas oryzae* and *Xanthomonas campestris*, and is predicted to have genes to produce non ribosomal peptide antibiotics. Characterization of *B. altitudinis* P-10 was conducted to determine potency as PGPR through qualitative test such as chitinolytic and cellulolytic activity, production of IAA (Indole Acetic Acid), production of HCN (Hydrogen Cyanide), phosphate dissolving ability and production of antibiotic compound. The results of qualitative research show that *B. altitudinis* P-10 has cellulolytic ability, ability to produce IAA and solubility of phosphate and production of compounds from non ribosomal peptide group namely bacitracin, gramicidin, surfactin, fengycin and bacillomycin D. *Bacillus altitudinis* P-10 PGPR through its ability in producing IAA, dissolving phosphate, cellulolytic activity and antibiotic production. It shows the potential of *B. altitudinis* P-10 as PGPR.

Keyword : *B. altitudinis*, PGPR

1. Pendahuluan

Salah satu kendala utama dalam sektor pertanian di Indonesia yaitu serangan hama dan patogen tanaman serta rendahnya tingkat kesuburan tanah yang menyebabkan penurunan produktivitas pertanian (Djatiniko *dkk.* 2011). Penggunaan bahan kimia pertanian untuk mengatasi masalah tersebut menyebabkan dampak negatif bagi lingkungan dan kesehatan konsumen (Wahyudi *et al.* 2011). Sistem pertanian organik dengan pemanfaatan agen hayati merupakan solusi dari permasalahan tersebut, salah satunya adalah pemanfaatan *Plant Growth Promoting Rhizobacteri* (PGPR).

Growth Promoting Rhizobacteri (PGPR) memiliki kemampuan untuk meningkatkan pertumbuhan serta meningkatkan ketahanan terhadap hama dan penyakit pada tanaman (Majeed *et al.* 2015; Agrawal dan Shruti, 2013). Mekanisme PGPR dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui mekanisme langsung dan tidak langsung. Mekanisme langsung melalui produksi fitohormon, kemampuan melarutkan fosfat dan kemampuan fiksasi nitrogen, sedangkan mekanisme tidak langsung melalui produksi enzim hidrolitik, siderofor, antibiotik dan sianida (Majeed *et al.* 2015). *Bacillus altitudinis* P-10 yang diisolasi

dari rhizosfer tanaman padi persawahan organik di Kecamatan Banyubiru, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah memiliki potensi sebagai PGPR yang memiliki kemampuan menghambat fitopatogen *Xanthomonas oryzae* dan *Xanthomonas campestris* (Maerani, 2014; Faizah, 2017), serta diprediksi memiliki gen untuk produksi antibiotik peptida non ribosomal (Budiharjo *et al.* 2017).

Kajian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui senyawa apa yang berperan pada mekanisme *B. altitudinis* P-10 sebagai agen biokontrol. Selain itu, karakterisasi terhadap potensi *B. altitudinis* P-10 diperlukan untuk mengetahui potensinya sebagai PGPR yang mampu memacu pertumbuhan tanaman. Karakterisasi kemampuan sebagai PGPR meliputi aktivitas enzim kitinolitik dan selulolitik, kemampuan produksi HCN, kemampuan menghasilkan fitohormon IAA, kemampuan melarutkan fosfat serta produksi antibiotik.

2. Metode

2.1 Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan isolat *B. altitudinis* P-10 dilakukan dengan mengambil 1 ose bakteri kemudian diinokulasikan pada medium NA baru pada cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam. Pewarnaan

Gram terhadap isolat bakteri dilakukan untuk mengetahui kemurniannya. Kultur bakteri yang telah murni selanjutnya dibuat kultur stok dan kultur kerja.

2.2 Analisis Kandungan IAA

Analisis kualitatif kandungan IAA dilakukan berdasarkan metode Kumar *et al.* (2012). Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium NA dengan penambahan triptofan 100 mg/L selama 48 jam pada suhu 30°C. Reagen Salkowsky diteteskan pada cawan petri berisi isolat dan diinkubasi pada tempat gelap selama 30 menit. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan memproduksi IAA ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada koloni bakteri dari semula berwarna putih menjadi merah muda. Kontrol positif yang digunakan adalah *Agrobacterium sp.*

2.3 Uji Kemampuan Melarutkan Fosfat

Uji kualitatif kemampuan melarutkan fosfat berdasarkan metode Kumar *et al.* (2012) dengan cara menginokulasikan bakteri pada medium selektif Pikovskaya yang mengandung g / L: Glukosa 10 ; trikalsium fosfat (TCP) (Ca_3PO_4) 5 ; amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,5 ; natrium klorida (NaCl) 0,2 ; kalium klorida (KCl) 0,2 ; magnesium sulfat (MgSO_4) 0,1 ; ekstrak

yeast 0,5 ; mangan sulfat (MnSO_4), fero sulfat (FeSO_4), dan agar 15. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Kontrol positif yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Kitinolitik

Uji kualitatif aktivitas enzim kitinolitik berdasarkan metode Ahmadian *et al.* (2007) :

a. Pembuatan Medium Kitin Agar

Lima g kitin dilarutkan dalam 75 mL HCl pekat kemudian dihomogenkan dan disimpan pada suhu 4°C selama satu malam. Sebanyak 400 mL aquades dingin ditambahkan pada larutan tersebut. Larutan tersebut kemudian dinetralkan dengan penambahan NaOH. Setelah mencapai pH 7.0 larutan kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama

30 menit dan dipisahkan antara endapan dan supernatannya. Koloid kitin yang didapatkan adalah hasil endapan yang berwarna putih susu. Koloid kitin kemudian digunakan sebagai bahan pembuatan medium kitin agar. Medium kitin agar

mengandung : 0,1 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
0,02 % K_2HPO_4 ; 0,1 %
yeast
extract; 1,5 % agar dan 0,5 % koloid
kitin.

b. Uji Kualitatif Aktivitas
Enzim Kitinolitik

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium kitin agar dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Zona bening disekitar koloni bakteri menunjukkan adanya aktivitas kitinolitik. Kontrol positif yang digunakan adalah *Serratia mercescent*.

**2.5 Uji Kualitatif Aktivitas
Enzim Selulolitik**

Uji kualitatif aktivitas enzim selulolitik dilakukan berdasarkan metode Kasana *et al.* (2008). Isolat bakteri diinokulasikan pada medium CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) agar (terdiri atas ekstrak *yeast* 0,2%, CMC agar 5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 2%, NaCl 0,25% dan akuades 1000 ml). Isolat bakteri diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Zona bening di sekitar koloni dideteksi dengan penambahan reagen Iodin Gram (mengandung KI 2 g, iodin 1 g, air destilasi 300 mL). Reagen iodin diteteskan pada cawan

petri berisi isolat bakteri kemudian didiamkan selama 3-5 menit. Zona bening di sekitar koloni yang menunjukkan aktivitas selulolitik. Kontrol positif yang digunakan adalah *S. mercescent*.

**2.6 Analisis Kualitatif Kandungan
HCN**

Analisa Kualitatif Kandungan HCN dilakukan berdasarkan metode Kumar *et al.* (2012). Isolat bakteri diinokulasi pada media NA yang mengandung 0,44% glisin. Indikator uji yaitu kertas pikrat dibuat dengan cara merendam kertas saring dalam larutan asam pikrat 1% dan larutan sodium karbonat (Na_2CO_3) 10%. Kertas spikrat diletakkan pada bagian atas cawan petri yang sudah diinokulasi dengan bakteri kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Isolat bakteri yang mampu memproduksi HCN ditunjukkan dengan perubahan pada kertas saring menjadi kuning-jingga atau merah-kecoklatan, sebagai kontrol positif yang digunakan adalah *P. aeruginosa*.

2.7 Identifikasi Senyawa Antibiotik

Identifikasi senyawa antibiotik menggunakan analisis FTIR dalam bentuk sampel cair. Preparasi sampel untuk analisa senyawa antibiotik berdasarkan metode (Filip *et al.* 2004).

Sampel disiapkan dalam bentuk cair. Isolat *B. altitudinis* P-10 diinokulasikan pada medium NB selama 24 jam pada suhu 30°C dalam inkubator *shaker*. Isolat bakteri kemudian diekstraksi untuk mendapatkan metabolit ekstraselulernya. Isolat bakteri dipisahkan antara medium pertumbuhan dan selnya menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang sehingga didapatkan pelet berupa sel bakteri. Pelet ditambahkan methanol kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dari pellet sehingga didapatkan sampel cair yang tidak mengandung sel bakteri.

3. Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penelitian, didapatkan hasil bahwa *B. altitudinis* P-10 memiliki kemampuan dalam memproduksi IAA, melarutkan fosfat dan memiliki aktivitas selulolitik. Hasil uji kualitatif dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kualitatif Potensi *B. altitudinis* P-10 sebagai PGPR

<u>Karakteristik</u>	<u>Hasil Uji</u>
Produksi IAA	+
Kemampuan melarutkan	+

fosfat

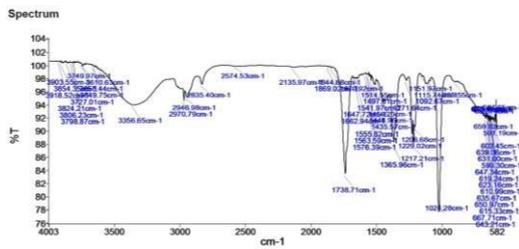
Produksi HCN	-
Aktivitas kitinolitik	-
<u>Aktivitas selulolitik</u>	<u>+</u>

keterangan : (+) positif, (-) negative

Kemampuan memproduksi IAA, melarutkan fosfat dan aktivitas selulolitik merupakan mekanisme langsung PGPR dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman. IAA merupakan fitohormon yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Kemampuan melarutkan fosfat menyediakan unsur hara bagi tanaman. Sundara *et al* (2002) menyatakan, bahwa Pemanfaatan mikroorganisme pelarut fosfat dapat melarutkan fosfat tidak tersedia menjadi tersedia, sehingga dapat diserap oleh tanaman. Aktivitas selulolitik penting dalam sistem pertanian berkelanjutan. Bakteri selulolitik berperan sebagai *biofertilizer* yang mampu meningkatkan kesuburan tanah. Limbah pertanian berupa sisa tanaman dapat dimanfaatkan sebagai kompos yang dapat meningkatkan kesuburan lahan pertanian (Mayrowani, 2012), sehingga menekan biaya operasional pertanian (Islam *et al.* 2016).

Hasil identifikasi senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh *B. altitudinis* P-10

menggunakan analisis FTIR didapatkan hasil berupa spektrum. Hasil yang didapatkan terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektrum FTIR *B. altitudinis* P-10 (Dokumen pribadi, 2018)

Peak-peak pada grafik menunjukkan serapan pita inframerah dari sampel yang kemudian diterjemahkan sebagai gugus fungsi berdasarkan panjang gelombangnya (cm^{-1}). Daerah serapan dengan panjang gelombang $3356,65 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan N-H atau O-H. Daerah serapan dengan panjang gelombang $2835,40\text{-}2970,79 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan C-H. Daerah serapan dengan panjang gelombang $1738,72 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan C=O keton atau C=O karboksilat yang diperkuat dengan adanya ikatan O-H pada panjang gelombang $3356,65 \text{ cm}^{-1}$ membentuk ikatan -COOH. Daerah serapan dengan panjang gelombang $1365,96 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan C-N. Daerah serapan dengan panjang gelombang $1206,68 - 1229,02 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan C-N atau C-C. Daerah

serapan dengan panjang gelombang $1024,28 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan C-N atau C-C. Rangkuman analisa gugus fungsi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pita serapan inframerah yang diperoleh dari *B. altitudinis* P-10 *free cell sample*

Panjang Gelombang (cm^{-1})	Ikatan Senyawa
3356,65	N-H atau O-H alkohol atau O-H karboksilat
2835,40 – 2970,79	C-H
1738,71	C=O keton atau C=O karboksilat
1365,96	C-N
1206,68 – 1229,02	C-N atau C-C
1024,28	C-N atau C-C

Identifikasi senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh *B. altitudinis* P-10 dilakukan melalui pendekatan kehadiran atau ketidakhadiran suatu gugus fungsional tertentu untuk dikenali. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Griffiths dan De Haseth (2007) bahwa spectrum inframerah memberikan

informasi yang lebih rinci melalui kehadiran atau ketidakhadiran suatu gugus fungsional tertentu untuk dikenali. Gugus fungsi yang terdeteksi pada spektrum FT-IR menunjukkan kemungkinan senyawa tersebut dihasilkan oleh *B. altitudinis* P-10. Berdasarkan gugus fungsi khas yang terdeteksi dari analisa FT-IR diketahui bahwa *B. altitudinis* P-10 menghasilkan senyawa antibiotik antara lain *Bacitrasin*, *Gramicidin*, *Colistin*, *Surfactin*, *Pumilacidin*, *Bacilibactin*, *Fengycin*, *Bacillomycin D*, dan *Bacillaene*. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Lu *et al.* (2017) dan Hasan *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa *Bacillus* sp. dapat memproduksi antibiotik *bacillomycin*, *fengycin*, *surfactin*, *bacillibactin*, *bacitracin* dan *gramicidin*.

Senyawa antibiotik yang didapatkan dari hasil penelitian kemudian dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu *non ribosomal peptide* (NRP), *Cyclic Peptide* (CP), dan siderofor. *B. Altitudinis* P-10 memproduksi antibiotik non- ribosomal peptida. Hasil penelitian sesuai dengan pernyataan Budiharjo *et al.* (2017) bahwa *B. altitudinis* P-10 diprediksi memiliki gen yang mengkode pembentukan peptida non ribosomal (NRP). Senyawa antibiotik *B. altitudinis* P-10 yang termasuk golongan NRP antara lain *Bacitracin*, *Gramicidin*, *Surfactin*, *Fengycin* dan

Bacillomycin D.

Analisis FTIR memberikan hasil berupa kemungkinan senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh *B. altitudinis* P-10. Oleh karena itu harus dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui secara pasti jenis senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh *B. altitudinis* P-10. Berdasarkan analisis FTIR, diketahui bahwa *B. altitudinis* P-10 dimungkinkan menghasilkan antibiotik antara lain *bacitracin*, *gramicidin*, *surfactin*, *fengycin* dan *bacillomycin D*. *Bacitracin*, *gramicidin* dan *surfactin* menghambat bakteri patogen, sedangkan *fengycin* dan *bacillomycin D* menghambat jamur patogen. Hal tersebut memungkinkan aplikasi *B. altitudinis* P-10 pada bidang agrikultur sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan bakteri dan jamur penyebab penyakit pada tanaman.

PGPR memiliki dua mekanisme dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman dan menginduksi ketahanan terhadap hama dan penyakit tanaman yaitu mekanisme langsung dan mekanisme tidak langsung. Mekanisme langsung berdampak langsung dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman yaitu melalui produksi fitohormon dan kemampuan menyediakan unsur hara bagi tanaman. Berdasarkan penelitian, *B. altitudinis* P-10 memiliki kemampuan menghasilkan auksin,

melarutkan fosfat dan memiliki aktivitas selulolitik yang berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman. Mekanisme tidak langsung berdampak tidak langsung dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman, yaitu berperan dalam proteksi tanaman terhadap fitopatogen. Berdasarkan penelitian, *B. altitudinis* P-10 menghasilkan antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan jamur dan bakteri patogen pada tanaman.

B. altitudinis P-10 memiliki potensi sebagai PGPR, karena memiliki karakteristik sebagai PGPR yang mampu meningkatkan pertumbuhan dan menginduksi ketahanan tanaman terhadap fitopatogen. Karakteristik tersebut ditunjukkan pada kemampuan menghasilkan auksin, kemampuan melarutkan fosfat dan aktivitas selulolitik yang merupakan mekanisme langsung dan kemampuan menghasilkan antibiotik yang merupakan mekanisme tidak langsung sebagai PGPR. Mekanisme langsung berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman, sedangkan mekanisme tidak langsung berperan dalam proteksi tanaman terhadap fitopatogen.

4. Kesimpulan

Bacillus altitudinis P-10 memiliki karakteristik sebagai PGPR melalui

kemampuannya dalam memproduksi IAA, melarutkan fosfat, aktivitas selulolitik dan produksi antibiotik. Hal tersebut menunjukkan potensi *B. altitudinis* P-10 sebagai PGPR.

Daftar Pustaka

- Agrawal, D. P. Kumar and A. Shruti. 2013. Characterization of *Bacillus* sp. Strains Isolated from Rhizosphere of Tomato Plant (*Lycopersicon esculentum*) for Their Use as Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J. Curr. Microbiol* 2 : 406-417
- Ahmadian, G., G. Degrassi, V. Venturi, D.R. Zeigler, M. Soudi and P. Zanguinejad. 2007. *Bacillus pumilus* SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases. *Microbiol* 103 :1081–1089
- Budiharjo, A., H. Jeong, D. Wulandari and S. Lee. 2017. Complete Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* P-10, a Potential Bioprotectant against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Isolated from Rice Rhizosphere in Java, Indonesia. *Genome Announcement* 48
- Djarmiko, H.A., B. Prakoso dan N. Prihatiningsih. 2011. Penentuan prototip dan keanekaragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pada

- tanaman padi di wilayah Karesidenan Banyumas. *J.HPT.Tropika* 11 (1): 35-36.
- Faizah, L. Nur. 2017. Optimasi Pertumbuhan dan Potensi Antagonistik *Bacillus pumilus* terhadap Patogen *Xanthomonas campestris* serta Identifikasi Molekuler Gen Penyandi PKS dan NRPS. *Skripsi*. Jur. Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Filip, Z., S. Herrmann and J. Kubat. 2004. FT-IR Spectroscopy Characteristics of Differently Cultivated *Bacillus subtilis*. *Microbiological Research* 159 : 257-262.
- Griffiths, P. R., J. A. de Haseth. 2007. Fourier Transform Infrared Spectrometry. Canada : John Wiley & Sons, Inc.
- Hasan, F., S. Khan, A. A. Shah and A. Hameed. 2009. Production of Antibacterial Compounds by Free and Immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pak. J. Bot.* 41 (3) : 1499-1510.
- Islam, S.I, A. M. Akanda, A. Prova, Md. T. Islam dan Md. M. Hossain. 2016. Solubilizing Bacteria on the Change in Soil Available Phosphorus and Sugarcane and Sugar Yield. *Field Crops Research* 77 : 43-49.
- Wahyudi, A.T., S.Meliah, dan A.A.Nawangsih.2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: isolasi, karakterisasi, dan telaah mutagenesis dengan transposon, *Makara Sains* 15 (1): 89-96.

