

**POTENSI RHIZOBAKTERI DARI TANAMAN KUBIS
(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) DAERAH GETASAN SEMARANG
SEBAGAI AGEN BIOBAKTERISIDA TERHADAP PATOGEN
*Xanthomonas campestris***

Maya Fitriana Ilul Fahmi, Anto Budiharjo¹, Agung Suprihadi¹

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang,
Semarang 50275 Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690
email: mayafitrianaillulfahmi@gmail.com

ABSTRACT

Rhizobacteria are bacteria that live around plant roots but do not cause negative effects on their host and are known to act as a biobactericide agent. The use of chemical-based pesticide against plant pathogen can be replaced with rhizobacteria. The objectives of this research were to isolate rhizobacteria from cabbage, explored from Getasan, Semarang and to determine the ability of the isolates to inhibit pathogens *Xanthomonas campestris* causing black rot on cabbage in vitro. The research consisted of rhizobacterial isolation, morphologic bacterial characterization, antibacterial test, and molecular and biochemical identification of the isolates. The isolation obtained seventeen rhizobacterial isolates. Four isolates (K.1, K.3, K.9 and K.12) showed potency as an biobactericide agent against pathogenic *X. campestris*. K.9 had the best ability to inhibit the growth of *X.campestris* by 12,6 mm. Based on molecular identification K.9 was *Bacillus cereus* strains BF15. Morphology and Biochemistry test showed that isolates K.9 is gram positive bacteria shaped bacilli, able to form an endospore, positive in hydrolysing starch, fermentation glucose, motile, aerobic and negative in the fermentation of manitol and arabinosa.

Keywords : *Antibacterial, Rhizobacteria, Cabbages, black rot disease, Xanthomonas. campestris*

ABSTRAK

Rhizobakteri merupakan bakteri yang hidup di sekitar perakaran tanaman, tidak menimbulkan efek negatif pada tanaman inangnya, dan diketahui dapat berperan sebagai agen biobakterisida. Penggunaan pestisida kimia untuk mengendalikan patogen tanaman dapat digantikan dengan memanfaatkan rhizobakteri. Tujuan penelitian ini ialah mengisolasi rhizobakteri dari tanaman kubis di daerah Getasan, Semarang serta menguji kemampuan isolat tersebut untuk menghambat pertumbuhan koloni patogen *Xanthomonas campestris* penyebab penyakit busuk hitam pada kubis secara in vitro. Penelitian ini dilakukan dengan isolasi rhizobakteri, karakterisasi isolat bakteri secara morfologi, uji antibakteri, identifikasi secara molekuler dengan 16S rRNA, dan uji konfirmasi biokimia. Hasil isolasi diperoleh tujuh belas isolat rhizobakteri dan terdapat empat isolat yang memiliki potensi sebagai agen biobakterisida terhadap patogen *X. campestris*. Isolat tersebut adalah K.1, K.3, K.9 dan K.12. Isolat K.9 memiliki daya hambat terbesar terhadap *X. campestris* yaitu 12,6 mm. Isolat ini diidentifikasi secara molekuler sebagai *Bacillus cereus* strain BF15. Hasil uji konfirmasi morfologi dan biokimia menunjukkan bahwa isolat K.9 merupakan bakteri gram positif berbentuk basil, dapat membentuk endospora, positif terhadap hidrolisis pati, fermentasi glukosa, bersifat motil serta hidup pada kondisi aerob dan negatif terhadap fermentasi arabinosa dan manitol.

Kata kunci : *Antibakteri, Rhizobakteri, Tanaman Kubis, Busuk hitam, Xanthomonas. Campestris*

PENDAHULUAN

Tanaman Kubis mempunyai arti ekonomi dan nutrisi yang penting karena sebagai sumber pendapatan petani di daerah dan sumber gizi seperti, vitamin A dan C, protein, lemak, karbohidrat dan serat yang sangat dibutuhkan oleh tubuh manusia (Sastrosiswojo *et al.*, 2005). Produksi kubis di Indonesia pada periode 2008 – 2012 cenderung mengalami kenaikan dari tahun

2008 dengan produksi sebesar 1.323.702, pada tahun 2009 produksi sebesar 1.358.113, pada tahun 2010 produksi sebesar 1.385.044, pada tahun 2011 produksi sebesar 1.363.741 dan pada tahun 2012 produksi sebesar 1.432.318 (Direktorat Jenderal Hortikultura, 2013). Penyakit busuk hitam (*black rot*) adalah salah satu penyakit yang paling merusak kubis. Penyakit tersebut sering ditemukan di daerah rendah akibat tanaman selalu basah untuk waktu yang lama,

sehingga memudahkan tersebarnya bakteri (Pracaya, 2001). Daun-daun kubis yang terserang penyakit busuk hitam mempunyai gejala terdapat bintik-bintik hitam dan dalam waktu singkat. Tanaman mati secara serentak (Direktorat Perlindungan Hortikultura, 2013). Penyakit busuk hitam disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas campestris*. Bakteri ini berbentuk batang, berukuran (0,7-3,0) μm x (0,4-0,5) μm , membentuk rantai, berkapsula, tidak berspora, dan bergerak dengan satu flagelum polar (Semangun, 1989).

Menurut Walangadi (2000), sebagian besar petani sayuran cenderung menggunakan pestisida secara berlebihan yang bertujuan untuk mengamankan produksi. Menurut konsep pertanian konvensional, penggunaan pestisida dilakukan secara berjadwal yang dilakukan sebelum terjadi serangan hama dan penyakit, sebagai langkah awal pencegahan.

Sistem budidaya pertanian konvensional yang dianut oleh petani hanya berorientasi pada upaya memaksimalkan produktivitas secara nyata namun kurang diikuti dengan kesadaran akan kemunduran kualitas lingkungan dan pengurangan stabilitas produksi. Tingginya penggunaan pestisida sintetik pada tanaman dapat menimbulkan pengaruh negatif, seperti resistensi hama, timbulnya hama sekunder atau hama baru, terbunuhnya parasit dan predator serta serangan berguna lainnya. Selain itu, tingginya residu pestisida yang terkandung dalam produk pertanian dapat menyebabkan keracunan pada manusia dalam jangka panjang.

Alternatif lain yang dapat dikembangkan dalam upaya pencegahan penggunaan pestisida kimiawi adalah dengan budidaya pertanian organik. Pertanian organik merupakan teknik pertanian yang tidak menggunakan bahan kimia, tetapi menggunakan bahan-bahan organik (Pracaya, 2003).

Pertanian organik dapat dilakukan dengan memanfaatkan agen hayati yang bersifat antagonis terhadap patogen tanaman, contohnya adalah penggunaan agen pengendali hayati yang berasal dari rizosfer tanaman. Penggunaan agen pengendali hayati sebagai alternatif penggunaan pestisida kimia semakin banyak dikembangkan sejalan dengan meningkatnya kesadaran terhadap dampak dari pestisida kimia tersebut. Rhizobakteri yang berasal dari rizosfer tanaman yang secara biologis telah menyatu dengan ekosistemnya, mempunyai kemampuan secara spesifik untuk menekan berbagai penyakit tanaman (Kennedy et al., 2004). Oleh karena itu penelitian mengenai isolasi rhizobakteri yang

beradaptasi dengan baik pada kondisi daerah setempat dan pengujian daya hambat terhadap pertumbuhan patogen *Xanthomonas campestris* perlu dilakukan. Evaluasi daya hambat rhizobakteri terhadap pertumbuhan koloni patogen secara *in vitro* merupakan langkah awal untuk mengetahui keefektifannya sebagai agen biobakterisida.

Karakterisasi isolat rhizobakteri secara molekuler juga perlu dilakukan. Hal itu bertujuan untuk mengetahui spesies isolat rhizobakteri potensial, sehingga mempermudah dalam hal produksinya sebagai agen biobakterisida. Karakterisasi secara molekuler dilakukan berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

METODELOGI

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel tanah kubis di daerah Getasan, akuades, isolat *Xanthomonas campestris* Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman Universitas Brawijaya, isolat *Bacillus subtilis* Laboratorium Mikrobiologi Universitas Diponegoro, *tryptic soy agar* (TSA), *tryptic soy broth* (TSB), agar, glukosa, arabinosa, manitol, triptikase, *fenol red*, *beef extract*, pepton, pati, larutan lugol, larutan kristal violet, larutan alkohol aseton, larutan safranin, *paper disc*, alkohol 70% Hidrogen Peroksida 3%, *malachite green* 5%, larutan safranin 0,5%, Klein A, Klein B, Klein C, *phospat buffer saline* (PBS), ddH₂O, minyak imersi, DNA marker, *etidium bromide* (EtBr), agarosa 1%, bufer TAE 1x, *loading buffer*, Saponin 0,5%, chelex 20%, akuabides, DNA primer 27F dan 1492R, Kapa (*Green Master Mix*), kapas, kasa, spirtus, tissue, aluminium foil, benang dan urutan basa nitrogen *Bacillus cereus* strain BF15 yang bersumber dari *National for Biotechnology Information* (NCBI).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah sebagai berikut: Pisau/cutter, kantong plastik, pipet, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, bunsen, *autoclave*, jarum ose, *spreader*, pinset, tabung reaksi, timbangan analitik, mikropipet, mikrotip, rak tabung reaksi, *rotary shaker*, vorteks, *hot plate*,

spektrofotometer, kuvet, gelas beker, batang pengaduk, kaca objek dan gelas penutup, rak pengecatan, mikroskop, timer, jangka sorong, mikrocentrifuge, tabung mikrotube, freezer, peralatan PCR, elektroforesis, gel-doc, inkubator, Laminar air flow, camera digital dan tabung durham.

Cara Kerja

a. Pengambilan Sampel Tanah Perakaran Kubis

Sampel tanah diperoleh dari perakaran tanaman kubis Desa Batur, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Tanah rizosfer berasal dari dua buah tanaman kubis dari lahan yang berbeda. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara memotong bagian tanaman di dekat pangkal akar untuk mengambil tanah yang melekat di sekitar perakaran tanaman. Kemudian akar beserta tanah yang masih melekat dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label sesuai dengan tempat, waktu dan tanggal pengambilan sampel.

b. Isolasi dan Pemurnian Isolat Rhizobakteri

Isolasi rhizobakteri dilakukan dengan menggunakan metode dari Syamsuddin (2013) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 10 gram tanah di sekitar daerah perakaran tanaman kubis dan butiran tanah yang melekat di permukaan akar dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL, berisi 90 mL akuades steril (pengenceran 10^{-1}) dan dikocok dengan rotary shaker berkecepatan 150 rpm selama 10 menit hingga homogen. Suspensi tanah 10^{-1} kemudian dipanaskan sampai suhu 80°C selama 30 menit untuk mendapatkan isolat dari genus *Bacillus*. Suspensi yang diperoleh diencerkan secara seri hingga 10^{-6} , dari setiap tahapan pengenceran dihomogenkan dengan vorteks. Suspensi tanah 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} masing-masing diambil 100 μL sampel dan disebarkan ke dalam cawan petri steril berisi media *Tryptic Soy Agar* (TSA). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak dua kali (duplo) dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 2×24 jam. Setiap koloni yang tumbuh dikarakterisasi morfologinya, meliputi bentuk, warna, tepi, elevasi, dan permukaan. Karakterisasi secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. Bakteri yang telah murni disimpan dalam TSA miring.

c. Uji Daya Hambat Rhizobakteri terhadap *Xanthomonas campestris*

Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi agar (Rostinawati, 2009) yang

dimodifikasi. Masing-masing isolat rhizobakteri dan bakteri uji yang berupa *X. campestris* ditanam dalam 5 ml media TSB sebanyak satu ose dan diinkubasi dalam suhu 30°C selama overnight. Sebanyak 1 mL kultur cair overnight *X. campestris* dituang ke dalam media TSA steril 100 mL. Media TSA yang telah tercampur bakteri *X. campestris* kemudian dikocok sampai suspensi tercampur dengan merata. Suspensi tersebut kemudian di tuang ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL dan ditunggu hingga memadat. Paper disc steril diletakkan secara aseptis pada permukaan agar, kemudian 15 μL kultur overnight isolat rhizobakteri diteteskan pada paper disc dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 1-2 hari. Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk di sekitar paper disc dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening yang terbentuk dikurangi dengan diameter pertumbuhan isolat uji (Ulya, 2009). Sebagai pembanding digunakan akuades sebagai kontrol negatif

d. Identifikasi Molekuler Isolat Rhizobakteri Potensial

Ekstraksi DNA

Isolat K.9 yang menghasilkan zona hambatan tertinggi selanjutnya dilakukan analisis molekuler yang diawali dengan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Chelex (Waish et al., 1991). Proses ekstraksi DNA diawali dengan perendaman kultur bakteri yang berumur 24 jam ke dalam larutan yang berisi 100 μL Aquabides dan 1 mL saponin 0,5% selama over night pada suhu 4°C , kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Pelet kemudian diambil dan ditambahkan 100 μL ddH₂O dan juga 50 μL chelex 20%. Suspensi tersebut kemudian dididihkan selama 10 menit, dan dikocok dengan vorteks setiap 5 menit, lalu sentrifugasi kembali, supernatan yang mengandung DNA genom bakteri diambil dan disimpan pada suhu 4°C untuk mencegah kerusakan DNA.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR berdasarkan metode yang diungkapkan oleh Radjasa et al. (2001). Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan perlakuan temperatur₀ yaitu sebagai berikut: Pradenaturasi pada 94°C selama 2 menit, untuk memanaskan DNA supaya untai ganda DNA

terpisah pada, kemudian 30 siklus (denaturasi pada 94°C selama 40 detik, annealing pada 55°C selama 40 detik, dan extension pada 72°C selama 1 menit), dilanjutkan dengan 42°C selama 1 menit serta final extension pada 72°C selama 5 menit dan terakhir 4°C. primer yang digunakan untuk PCR 16S rRNA adalah primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Long dan Azam, 2001). Bahan-bahan yang digunakan dalam proses PCR ini yaitu 3 µL DNA *sample* 1,5 µL primer universal 27F; 1,5 µL primer 1492R ; 25 µL Kapa (*Green Master Mix*); dan 19 µL ddH₂O. Produk reaksi PCR kemudian diamati dengan elektroforesis gel dengan menggunakan konsentrasi agarosa 1%.

Elektroforesis DNA

Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 1 %. Agarosa ditimbang sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam 100 mL buffer TAE 1x. Agarosa dilarutkan ke dalam *microwave oven* selama 1 menit. Agarosa yang telah larut kemudian didinginkan hingga memiliki suhu sekitar 55°C lalu ditambahkan EtBr sebanyak 5,33 µL. Cetakan elektroforesis disiapkan dan sisir dipasang pada atangi elektroforesis. Campuran kemudian dituang dalam *gel tray* yang dipasang sisir untuk mencetak sumuran. Sisir elektroforesis kemudian diambil setelah gel memadat. Gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan buffer elektroforesis dengan konsentrasi larutan TAE 1x.

Produk PCR yang akan dielektroforesis diambil sebanyak 5 µL dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran gel. DNA marker juga dimasukkan ke dalam sumuran. Tegangan yang digunakan sebesar 100 V selama 30 menit. Hasil elektroforesis kemudian diamati dengan *gel-doc*. Produk PCR dikatakan berhasil jika hanya tampak satu pita DNA dengan panjang basa yang sesuai dan dapat dibandingkan dengan DNA marker. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya dikirim ke PT Genetika Science (Jakarta, Indonesia) untuk penentuan sekuens 16S rRNA.

Analisis sekuens

Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan menyajajarkan urutan nukleotida dengan sekuens yang diduga terdapat dalam *gene bank* menggunakan program MEGA 5.05. Daerah yang memiliki kesamaan urutan sekuens dianalisis kembali menggunakan penyajajaran yang terdapat dalam fasilitas penyajajaran *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk

menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di *gene bank*.

e. Uji konfirmasi secara morfologi, mikrobiologi dan biokimia Isolat K.9

Uji Endospora

Satu ose suspensi rhizobakteri isolat K.9 dicampurkan dengan akuades steril yang telah ditetesi pada kaca preparat dan kemudian dilewatkan di atas nyala api bunsen, ditetesi klein A didiamkan selama 5 menit, cuci dengan air mengalir dan keringanginkan, lalu ditetesi klein B didiamkan 2 menit, cuci dengan air mengalir dan keringanginkan, selanjutnya ditetesi klein C didiamkan 2 menit, cuci dengan air mengalir dan keringanginkan, kemudian amati di bawah mikroskop.

Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menanamkan isolat K.9 pada media TSA semi solid dengan cara tusuk (*stab inoculation*) sedalam 5 cm, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1x24 jam. Hasil positif (motil) ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar di sekitar tusukan inokulasi dan juga pada permukaan media yang semi solid, hasil negatif ditunjukkan jika bakteri hanya tumbuh pada daerah tusukan saja.

Uji Katalase

Koloni isolat K.9 diambil dari media TSA diambil sebanyak satu ose, kemudian digoreskan di atas kaca objek yang kering. Hidrogen peroksida 3% ditetaskan sebanyak 2-3 tetes pada usapan bakteri. Apabila terbentuk gelembung udara, maka uji katalase dinyatakan positif. Bakteri aerob memberikan reaksi yang positif terhadap uji katalase, sedangkan bakteri anaerob tidak menunjukkan reaksi yang positif.

Uji Hidrolisis Pati

Satu ose isolat K.9 ditanam dengan metode goresan pada medium agar pati. Kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Larutan lugol ditetaskan di sekitar biakan setelah terlihat pertumbuhan koloni dan dibiarkan selama 5 menit. Hasil yang tampak diamati dan dicatat. Uji hidrolisis pati positif terdapat daerah bening pada medium yang mengandung pati setelah penambahan larutan lugol.

Uji Fermentasi Karbohidrat

Satu ose isolat K.9 diinokulasikan

kemedium glukosa cair fenol merah, arabinosa cair fenol merah dan manitol cair fenol merah (dengan tabung durham). Kultur diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar. Perubahan yang terjadi diamati dan dicatat. Uji fermentasi karbohidrat positif jika warna merah medium fermentasi berubah menjadi kuning.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi rhizobakteri dari perakaran kubis menghasilkan tujuh belas isolat rhizobakteri, ke-tujuh belas isolat yang ditemukan umumnya berbentuk circular, berwarna putih susu sampai krem keputihan, tepian rata, elevasi raised dan flat, ukuran sedang, bentuk sel basil dan kebanyakan merupakan bakteri Gram positif.

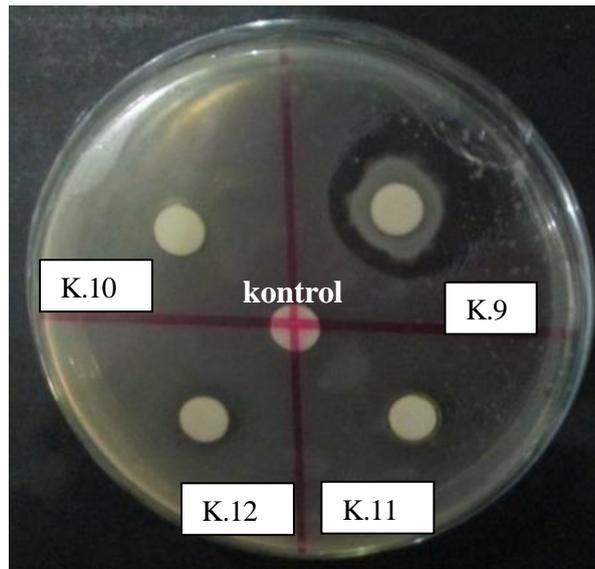
1. Uji Antibakteri Isolat Rhizobakteri

Tujuh belas isolat rhizobakteri tersebut kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap Patogen *Xanthomonas campestris* untuk mengetahui aktivitas antibakteri. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 1 di bawah ini.

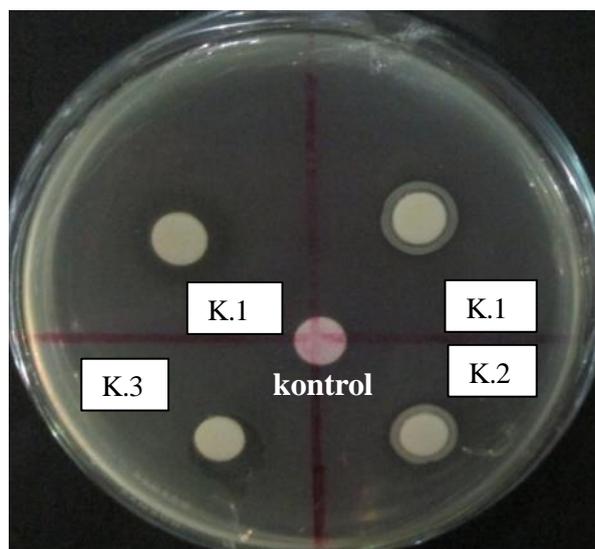
Tabel 1. Aktivitas antibakteri isolat rhizobakteri terhadap *Xanthomonas campestris*

No	Isolat	Diameter Keseluruhan zona bening (mm)	Diameter koloni rhizobakter (mm)	Zona hambat yang dihasilkan (mm)
1	K.1	13,3	8,0	5,3
2	K.2	-	-	-
3	K.3	11,2	8,0	3,2
4	K.4	-	-	-
5	K.5	-	-	-
6	K.6	-	-	-
7	K.7	-	-	-
8	K.8	-	-	-
9	K.9	31,05	18,45	12,6
10	K.10	-	-	-
11	K.11	-	-	-
12	K.12	10,05	8,0	2,05
13	K.13	-	-	-
14	K.14	-	-	-
15	K.15	-	-	-
16	K.16	-	-	-
17	K.17	-	-	-

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ke-tujuh belas isolat diperoleh empat isolat yang menghasilkan zona hambatan yaitu isolat K.1, K.3, K.9 dan K.12. Berikut adalah zona hambatan yang diperoleh masing-masing isolat yang disajikan pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Uji aktivitas antibakteri isolat K.9 & K.12 terhadap *X. campestris* inkubasi 24 jam pada suhu 30°C



Gambar 2. Uji aktivitas antibakteri isolat K.1 & K.3 terhadap *X. campestris* inkubasi 24 jam pada suhu 30°C.

Kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Xanthomonas campestris* ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar isolat rhizobakteri. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan melihat zona bening yang terbentuk dikurangi dengan diameter pertumbuhan isolat rhizobakteri (Ulya, 2009). Isolat K.9 mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *X. campestris* dengan membentuk zona hambatan yaitu sebesar 12,6 mm, sedangkan isolat K.1, K.3 dan K.12 secara berturut-turut membentuk diameter zona hambat sebesar 5,3 mm, 3,2 mm dan 2,05. Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan bahwa isolat K.9

memiliki daya hambat kuat terhadap bakteri gram negatif *X. campestris*, sedangkan isolat K.1 memiliki daya hambat sedang dan untuk isolat K.3 dan K.12 memiliki daya hambat lemah terhadap bakteri *X. campestris*. Penentuan kriteria ini berdasarkan Davis & Stout (1971 dalam Dewi, 2010) yang melaporkan bahwa ketentuan kekuatan daya antibakteri sebagai berikut: zona hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, zona hambatan 10-20 mm kategori kuat, zona hambatan 5-10 mm kategori sedang, dan zona hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah.

Zona hambat yang terbentuk mengindikasikan bahwa isolat K.1, K.3 K.9 dan K.12 dapat menghasilkan senyawa anti mikroba ekstraseluler yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba dalam hal ini *X. campestris*. Senyawa anti mikroba yang dihasilkan dapat berupa antibiotik, dan enzim degradatif seperti kitinase, glukonase (Kavitha & Vijayalakshmi, 2007 dalam Ulya, 2009).

Aktivitas penghambatan senyawa anti mikroba secara umum dapat dilakukan dengan berbagai mekanisme, di antaranya adalah: merusak dinding sel dengan cara menghambat pembentukan maupun merubah setelah terbentuk; merubah permeabilitas membran sel. Kerusakan pada membran sel berakibat terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel, karena membran bertujuan memelihara integritas komponen-komponen seluler; merubah molekul protein dan asam nukleat; menghambat kerja enzim yang mengakibatkan terganggunya metabolisme sel atau matinya sel; menghambat sintesa asam nukleat dan protein yang berakibat terganggunya aktivitas metabolisme karena DNA, RNA, dan protein memegang peranan penting dalam mekanisme sel secara normal (Pelezar & Chan, 2005 dalam Ulya, 2009).

Rhizobakteri yang sering dimanfaatkan sebagai agen biobakterisida diantaranya adalah anggota dari genus *Bacillus* dan *Pseudomonas*. Namun penggunaan rhizobakteri yang berasal dari genus *Bacillus* lebih menguntungkan karena dapat membentuk endospora yang memiliki sifat sangat resisten terhadap panas, kekeringan dan zat kimiawi (Sridhar, 2010).

Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang dapat digunakan sebagai agen biokontrol (Jack et al., 1995), karena menghasilkan zat antimikroba yang berupa antibiotik dan bakteriosin. Namun pada umumnya senyawa antimikroba yang dihasilkan genus *Bacillus* berupa bakteriosin. Bakteriosin adalah peptida antimikroba yang

disintesis secara ribosomal yang dihasilkan sejumlah bakteri (Martirani et al., 2002) dan mempunyai pengaruh bakterisidal dan bakteriostatik terhadap bakteri yang mempunyai hubungan dekat dengan bakteri penghasilnya (Ko & Ahn, 2000). Terdapat berbagai macam jenis bakteriosin yang diproduksi oleh genus *Bacillus* diantaranya adalah cerein yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* (Oscariz & Pisabarro, 2000), subtilin, subtilosin yang dihasilkan oleh *B. subtilis* (Stein et al., 2004), megacin yang dihasilkan oleh *B. megaterium* (Tagg et al., 1976), coagulin yang dihasilkan oleh *B. Coagulans* (Hyronimus et al., 1998), tochicin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* (Paik et al., 1997) dan bacillocin yang dihasilkan oleh *B. liceniformis* (Martirani et al., 2002).

Mekanisme kerja bakteriosin dalam melawan bakteri lain secara umum dengan menyerang membran sitoplasma (Montville & Chen, 1998) melalui pembentukan pori membran sitoplasma (Sablou et al., 2000) dan penembusan membran sel sehingga meningkatkan permeabilitas membran sitoplasma (Jack et al., 1995) atau penghambatan pembentukan septum (Martinez et al., 2000).

2. Identifikasi Isolat Rhizobakteri Potensial Secara Molekuler

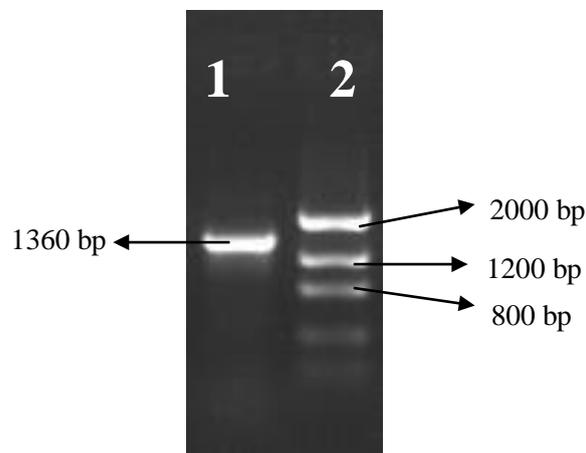
Isolat terbaik yang menghasilkan daya hambatan tertinggi yaitu isolat K.9, selanjutnya dilakukan karakterisasi secara molekuler untuk mengetahui jenis ataupun spesiesnya. Karakterisasi molekuler dilakukan berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA dengan metode *Polymerase chain reaction* (PCR). Tahap ini diawali dengan ekstraksi DNA genom untuk mendapatkan total DNA secara keseluruhan dari sel bakteri. Penggunaan metode chelex tergolong cepat dan sederhana dibandingkan dengan metode lain, selain itu juga DNA menjadi lebih tahan lama karena dapat terhindar dari kerusakan secara enzimatis. Suspensi tersebut kemudian dididihkan selama 10 menit, lalu sentrifuge kembali, supernatan yang mengandung DNA genom bakteri diambil dan disimpan pada suhu 4°C untuk mencegah kerusakan DNA.

Hasil ekstraksi DNA kemudian diamplifikasi menggunakan PCR. DNA yang diamplifikasi adalah daerah 16S rRNA yang merupakan daerah konservatif dan urutan basanya bervariasi sehingga dapat digunakan untuk menentukan hubungan filogenetik bakteri. Yuwono (2008) menjelaskan bahwa PCR adalah

suatu metode enzimatik untuk melipat gandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Sekuens yang digandakan adalah 16S rRNA dengan menggunakan primer universal bakteri 27F dan 1492R. Menurut Bottger (1996) aplikasi molekular untuk menganalisis keragaman mikroba melalui analisis gen 16S rRNA sesuai untuk mengidentifikasi mikroorganisme karena 16S rRNA mampu mewakili semua informasi filogenetik dan lebih praktis. Gen 16S rRNA terdapat pada semua organisme prokariot yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri

melalui perbedaan dan variasi urutan pasangan basanya.

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis untuk mengetahui ukuran DNA. Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan dan memurnikan fragmen-fragmen DNA. Pemisahan fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan medan listrik sehingga panjang fragmen dapat diidentifikasi. (Ausubel *et al.*, 1998; Clark & Christopher, 2008). Hasil dari elektroforesis divisualisasi dengan menggunakan *Gel-doc*. Visualisasi hasil PCR pada *Gel-doc* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi hasil amplifikasi sekuens 16S rRNA isolat K.9 pada konsentrasi gel agarosa 1% (lane 1 = Isolat K.9, lane 2 = marker DNA)

Produk PCR tersebut selanjutnya dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan basa nitrogen. Berdasarkan hasil sekuensing diperoleh bahwa isolat K.9 memiliki susunan basa

sebanyak 1360 bp. Urutan basa nitrogen hasil sekuensing isolat bakteri K.9 dapat dilihat pada Gambar 4.

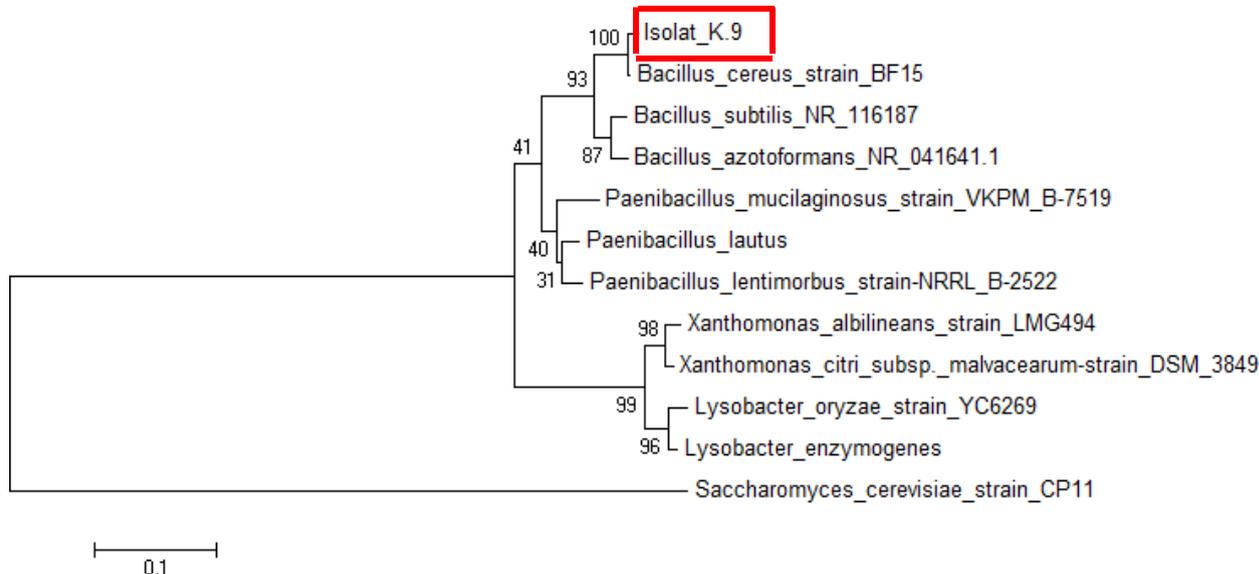
```

GGGCGGGTGCTATAATGCAGTCGAGCGAATGGATTAGAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAC
GCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCAATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTCTGAAAACCTTAGAGATAGG
GCTTCTCCTCGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCCTGTCGGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACCAAGCGCAACCTTTGATCTTAAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTTAAGGGTAACTGCCCGGTGAC
AAACCCGGAAGAAAGGTGGGGGATAGACGTCAAAAATCATTATGCCCTTAAAGACCTTGGGCTTACACACGTGGC
GTAAAATGGAACGGGTACAAAAGAGCTTGCAAGAACCCGAAAGTTGGAACCTAATCTCTGAAAAACCGGTTTCC
ATTCGGAATTGTAGCCTGACCTTCGGCCTTACAATGGAAACTGGGAAA
    
```

Gambar 4. Urutan basa nitrogen hasil sekuensing isolat K.9. (A= Adenin; T= Timin; G= Guanin, C= Sitosin)

Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan urutan basa isolat yang dimiliki oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Hasil menunjukkan bahwa terdapat kesamaan homologi sebesar 97% terhadap bakteri *Bacillus cereus* strain BF15.

Hasil sekuensing dilanjutkan dengan merekonstruksi pohon filogenetik (Gambar 5). Pohon filogenetik dibuat dalam bentuk *neighbor joining* dengan beberapa jenis bakteri penghasil antibakteri dan beberapa genus bakteri lainnya sebagai pembanding.



Gambar 5. Pohon filogenetik isolat K.9

Uji *bootstrap* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menguji reabilitas pohon filogenetik. Nilai *bootstrap* terletak pada cabang-cabang pohon filogenetik. Berdasarkan pohon filogenetik yang terbentuk pada Gambar 5, diketahui bahwa hasil percabangan isolat K.9 dan bakteri *B. cereus* strain BF15 menunjukkan nilai *bootstrap* 100%. Hal tersebut menunjukkan bahwa posisi filogenetik tersebut telah maksimal dan tidak akan ada percabangan baru di antara cabang tersebut, sehingga dapat dikatakan isolat K.9 dan bakteri *B. cereus* strain BF15 sangat kuat berada dalam satu kelompok/klad yang sama didukung oleh nilai *bootstrap* yang melebihi 90% (Wijaya, 2013).

Panjang suatu cabang pada pohon filogeni yang berbeda-beda antar spesies menunjukkan perbedaan basa nukleotida dan laju evolusinya. Semakin panjang cabang yang terbentuk menunjukkan spesies tersebut memiliki perbedaan basa DNA yang lebih besar daripada spesies lainnya. Sebaliknya, semakin pendek suatu cabang menunjukkan perbedaan basa nukleotida dan laju evolusi yang lebih sedikit (Wijaya, 2013). Selanjutnya dilakukan uji endospora, katalase, motilitas, hidrolisis pati dan fermentasi karbohidrat.. Uji ini dimaksudkan untuk konfirmasi beberapa karakteristik yang dimiliki oleh isolat K.9 yang kemudian dibandingkan

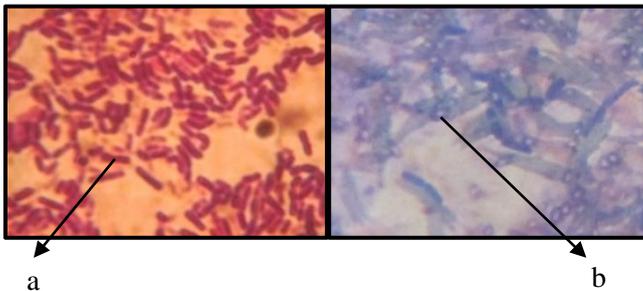
dengan karakteristik isolat *Bacillus cereus* berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Hasil karakterisasi tersebut ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik morfologi, mikrobiologi dan biokimia isolat K.9 dibandingkan dengan *B. cereus*

Karakteristik yang diamati	Sifat Isolat K.9	<i>B. cereus</i>
Pewarnaan Gram	+	+
Bentuk	Batang	Batang
Spora	+	+
Aerobik	+	+
Motil	+	+
Hidrolisis Pati	+	+
Fermentasi Karbohidrat	+	+
• Glukosa	-	-
• Arabinosa	-	-
• Manitol	-	-

Keterangan : Tanda + menunjukkan hasil uji positif
Tanda – menunjukkan hasil uji negatif

Perbandingan yang terlihat pada Tabel 2. menunjukkan bahwa isolat K.9 memiliki karakteristik morfologi, mikrobiologi dan biokimia yang sama dengan *B. cereus*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang yang dapat membentuk endospora (Gambar 6). Mampu hidup pada kondisi aerob, bersifat motil dengan ditunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar di sekitar tusukan inokulasi medium semisolid. Hasil uji hidrolisis pati menunjukkan bahwa isolat K.9 positif dapat menghidrolisis pati, dengan ditunjukkan adanya daerah yang bewarna bening di sekitar isolat. Uji fermentasi Karbohidrat menunjukkan bahwa isolat K.9 positif dapat memfermentasikan glukosa yang ditunjukkan adanya perubahan warna pada medium cair *Glucose Phenol Red* yang semula berwarna merah menjadi berwarna kuning dan menunjukkan uji negatif terhadap arabinosa dan manitol.



Gambar 6. a. Sel vegetatif isolat K.9
b. Endospora isolat K.9

SIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Diperoleh tujuh belas isolat rhizobakteri dari tanaman kubis di daerah Getasan Semarang.
2. Terdapat empat isolat yang memiliki potensi sebagai agen biobakterisida untuk mengendalikan patogen *Xanthomonas campestris* yaitu isolat K.1, K.3, K.9 dan K.12. Isolat K.9 memiliki kemampuan terbesar dalam menghambat pertumbuhan patogen *Xanthomonas campestris* dengan diameter daya hambat sebesar 12,6 mm.
3. Isolat K.9 tersebut berdasarkan identifikasi secara molekuler merupakan *Bacillus cereus* strain BF15. Isolat K.9 termasuk bakteri Gram positif yang menunjukkan uji positif terhadap motilitas, hidrolisis pati, fermentasi glukosa, negatif terhadap fermentasi arabinosa serta manitol dan mampu membentuk endospora yang resisten terhadap panas, kekeringan dan zat kimiawi sehingga menguntungkan sebagai agen biobakterisida.

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Willey & Son, Canada.
- Bottger, E.C. 1996. Approachs for Identification of Microorganism. *ASM News*. 62:227-250.
- Clark, W. & K. Christopher. 2008. *An Introduction to DNA : Spechtrphotometry, Degradation and the "Frangekel" Experimen* <http://www.zoo.utoronto.ca/>. Diakses 30 Juni 2014.
- Dewi, F.K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, Linnaeus) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Direktorat Jenderal Hortikultura. 2013. *Perkembangan Produksi Tanaman Sayuran Periode 2008 – 2012*. <http://hortikultura.deptan.go.id/>. Diakses tanggal 25 Oktober 2013.
- Direktorat Perlindungan Hortikultura. 2013. *Busuk Hitam*. www.ditlin.hortikultura.deptan.go.id. Diakses tanggal 18 November 2013.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneat, J.T. Staley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams & Wikins Company, Baltimore, U.S.A.
- Hyronimus, B., C.L. Marrec & M.C. Urdaci. 1998. Coagulin, a Bacteriocin like Inhibitory Substance Produced by *Bacillus coagulans* I4. *Applied Microbiology* 85: 42-50.
- Jack, R.W., J.R. Tagg & B. Ray. 1995. Bacteriosin of Gram positive bacteria. *Microbiology Rev*. 59(2): 171-200.
- Kennedy I.R., A.T.M.A. Choudhury & M.L. Kecskés. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in cropfarming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology and Biochemistry* 36 : 1229–1244.
- Ko, S.H. & C. Ahn. 2000. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from White Kimchi. *Food Sci. Biotechnology* 9(4):263-269.
- Martinez, B., A. Rodriguez & J.E. Suarez. 2000. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in *Lactococci*. *Microbiology* 146:949-955.

- Martirani, L., M. Varcamonti, G. Naclerio & M. De Felice. 2002. Purification and Partial characterization of Bacillon 490, a novel bacteriocin produced by thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbiology Cell Fact* 1(1):1.
- Montville, T.J. & y. Chen. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology Biotechnology* 50(5):511-519.
- Oscariz, J.C. & A.G. Pisabarro. 2000. Characterization and Mechanism of Action of Cerein 7, a Bacteriocin Produced by *Bacillus cereus* Bc 7. *Applied Microbiology* 89: 361-369.
- Paik, H.D., S.S. Bae & S.H. Park. 1997. Identification and Partial Characterization of Tochinin a Bacterion Produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tochingsiensis*. *Industry Microbiology Biotechnology* 19: 294-298.
- Pracaya. 2001. Kol alias Kubis Edisi Revisi. Jakarta : Penebar Swadaya.
- . 2003. Bertanam Sayuran Organik di Kebun, Pot, dan Polibag. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Radjasa, O.K., T. Mrtens, H.P. Grossart, T. Brinkoff, A. Sabdono & M. Simon. 2001. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA approach. *Mar. Biotechnol.* 3:454-462.
- Rostinawati, T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar. *Penelitian Mandiri*. Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Sablon, E., B. Contreras & E. Vandamme. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: Made of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 68:21-60.
- Sastrosiswojo S., S.T. Uhan & R. Sutarya. 2005. Penerapan Teknologi PHT pada Tanaman Kubis. Bandung: Balai Penelitian Tanaman Sayuran.
- Semangun, H. 1989. Penyakit-penyakit tanaman hortikultura di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sridhar, P.N. 2010. Anatomy of Bacteria cell. <http://www.microrao.com>. Diakses tanggal 19 Agustus 2014.
- Stein T., S. Dusterhus, A. Stroh & K.D. Entian. 2004. Subtilisin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. *Applied Environmental Microbiology* 70:2349-2353.
- Syamsuddin & M. A. Ulin. 2013. Daya Hambat Rhizobakteri Kandidat Agens Biokontrol Terhadap Pertumbuhan Koloni Patogen *Phytophthora capsici* Secara In Vitro. *Florateg* 8 : 64-72.
- Tagg, J.R. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Review* 40: 722-756.
- Ulya, J. 2009. Kemampuan Penghambatan *Streptomyces* spp. Terhadap Mikroba Patogen Tular Tanah pada beberapa Kondisi Pertumbuhan: Jenis Media, Waktu Produksi, pH, dan Suhu. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Walangadi, D. 2000. Kebijakan pengaturan residu pestisida: implementasinya pada komoditi hortikultura (*tesis*). Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Waish, P.S., D.A. Metzger, R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 506-513.
- Wijaya, G.S.J. 2013. Struktur Genetik dan Filogenetik Ikan Tuna (*Thunnus* spp.) di TPI Tanjung Luar, Lombok Berdasarkan DNA Mitokondria. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Yuwono, T. 2008. Bioteknologi Pertanian. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.