

**EKSPLORASI RHIZOBAKTERI INDIGENOUS TANAMAN CABAI RAWIT
(*Capsicum frutescens* Linn.) DARI PERTANIAN SEMI ORGANIK DESA BATUR
KABUPATEN SEMARANG SEBAGAI AGEN HAYATI PENGENDALI
PERTUMBUHAN JAMUR *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici***

M. Eka Prastya , Agung Suprihadi¹, Endang Kusdiyantini¹

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang,
Semarang 50275 Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690
email: muhammadprastyajuni2011@gmail.com

ABSTRACT

Rhizobacteria is a group of bacteria that live in the around of plant roots. This type of bacteria known have the ability to stimulate plant growth by producing growth hormone, as well as to inhibit the growth of plant pathogens synthesise compounds with antibiotics or extracellular enzymes. The purpose of this study was to obtain and describe the morphological, biochemical and genetic isolates rhizobacteria of semi-organic farmland Semarang District village Batur which has the ability as a biological control agent of fungal pathogens *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici*. The results obtained fifteen isolates the majority rhizobacteria bacilus shaped gram-positive and classified. Rhizobacteria inhibition test capabilities against pathogenic fungi was performed using dual culture test and test biomass. Dual culture test results showed that the inhibition of isolates E₁ has a 3.77%, 1.88% isolates E₃ and E₁₅ isolates 22%. The biomass tests show E₁₅ isolates capable of inhibiting the growth of pathogenic fungi best with the smallest weight of fungal biomass 0.0386 grams. The results of the molecular characterization based on 16S rRNA gene sequences to known that E₁₅ isolates has similar with *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 with similarity of 97%. The results of the biochemical characterization of isolates E₁₅ has similarities with *B. cereus* species that is catalase positive, motile, have endospores, is able to hydrolyze starch and ferment glucose.

Keywords: rhizobacteria, Fusarium oxysporum f.sp *capsici*, gen 16S rRNA, *Bacillus cereus*

ABSTRAK

Rhizobakteri merupakan kelompok bakteri yang hidup di sekitar daerah perakaran tanaman. Jenis bakteri ini diketahui memiliki kemampuan untuk memacu pertumbuhan tanaman dengan memproduksi hormon pemacu tumbuh, serta mampu menghambat pertumbuhan patogen tanaman dengan mensintesis senyawa antibiotik atau enzim ekstraseluler. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh dan mendeskripsikan secara morfologi, biokimia dan genetik isolat rhizobakteri dari lahan pertanian semi organik Desa Batur Kabupaten Semarang yang memiliki kemampuan sebagai agen hayati pengendali pertumbuhan patogen jamur *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici*. Hasil isolasi diperoleh lima belas isolat rhizobakteri yang mayoritas berbentuk bacilus dan tergolong gram positif. Kemampuan uji penghambatan rhizobakteri terhadap jamur patogen dilakukan menggunakan uji kultur ganda dan uji biomassa. Hasil uji kultur ganda menunjukkan bahwa isolat E₁ memiliki daya hambat 3,77%, isolat E₃ 1,88% dan isolat E₁₅ 22%. Uji biomassa menunjukkan isolat E₁₅ mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen terbaik dengan berat biomassa jamur terkecil yakni 0,0386 gram. Hasil karakterisasi molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rRNA diketahui isolat E₁₅ identik dengan spesies *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 dengan kemiripan sebesar 97%. Hasil karakterisasi biokimia isolat E₁₅ memiliki kemiripan dengan spesies *B. cereus* yakni katalase positif, motil, memiliki endospora, mampu menghidrolisis pati dan memfermentasikan glukosa.

kata kunci: rhizobakteri, *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici*, gen 16S rRNA, *Bacillus cereus*

PENDAHULUAN

Pertambahan jumlah penduduk yang sangat pesat menyebabkan kebutuhan pangan semakin meningkat. Langkah – langkah strategis telah diambil untuk

memenuhi kebutuhan pangan antara lain dengan intensifikasi sistem pertanian melalui penggunaan pupuk sintetis, pestisida dan bibit unggul. Namun penggunaan pestisida dan pupuk kimia

dapat menyebabkan kerusakan sifat fisik, kimia dan biologi tanah. Kondisi ini mendorong berkembangnya sistem pertanian yang ramah lingkungan dengan menggunakan agen biologi atau dikenal sebagai pertanian organik.

Mayrowani (2012) melaporkan perkembangan areal pertanian organik di Indonesia dari tahun 2007-2011 meningkat secara signifikan. Perkembangan tersebut mencapai 449% yakni dari 40.970 ha menjadi 225.063 ha pada tahun 2011. Meningkatnya penerapan sistem pertanian organik ternyata menimbulkan permasalahan baru yakni munculnya patogen biologi baik berupa bakteri, jamur, virus atau serangga yang menyerang tanaman pertanian, sehingga berdampak menurunnya produksi secara drastis. Salah satu contoh patogen tersebut adalah jamur *Fusarium oxysporum* penyebab penyakit layu fusarium pada tanaman cabai, khususnya cabai rawit (*Capsicum frutescens*). Menurut Rostini (2011), penyakit ini dapat menyebabkan kerugian dan gagal panen hingga 50% pada tanaman cabai rawit (*C. frutescens*).

Rhizobakteri merupakan kelompok mikroorganisme tanah yang hidup dan berkembang dengan baik pada daerah sekitar akar (rhizosfer) yang kaya akan bahan organik (Compant et al., 2005). Bakteri ini diketahui aktif mengkolonisasi di daerah akar tanaman dan memiliki 3 peran utama bagi tanaman yaitu sebagai biofertilizer yang mampu mempercepat proses pertumbuhan tanaman melalui percepatan penyerapan unsur hara, sebagai biostimulan yang dapat memacu pertumbuhan tanaman melalui produksi fitohormon dan sebagai bioprotektan yang mampu melindungi tanaman dari patogen (Rai, 2006). Menurut Bakker & Van Loon (2003), keberadaan rhizobakteri dapat mengurangi populasi patogen tumbuhan melalui kompetisi serta produksi senyawa antimikroba. Kemampuan inilah yang bisa dimanfaatkan sebagai agen biologi untuk

mencegah atau mengurangi kerusakan akibat patogen tumbuhan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan A'yun (2013) pemberian PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) kombinasi *Pseudomonas fluorescens* dan *Azotobacter* sp. dapat menurunkan intensitas serangan TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) pada tanaman cabai rawit hingga 89,2%. Chakraborty et al. (2006) melaporkan bahwa *Bacillus megaterium* bersifat antagonis terhadap empat patogen seperti *Fusarium lamaroensis*, *Phytophthora hypobrymea*, *Sclerotium repens*, dan *Sclerotium rolfsii* dengan efek penghambatan tertinggi pada *S. rolfsii* dan *F. lamaroensis* dengan daya penghambatan sebesar 55% - 84%. Penelitian tentang rhizobakteri indigenous tanaman cabai rawit (*C. frutescens*) yang berasal dari pertanian organik Desa Batur, Kecamatan Getasan Kabupaten Semarang perlu dilakukan karena salah satu potensi rhizobakteri adalah sebagai agen hayati. Rhizobakteri yang diperoleh diharapkan memiliki aktivitas antagonisme terhadap jamur patogen *Fusarium oxysporum* yang selama ini menjadi hama potensial pada tanaman cabai rawit (*C. frutescens*). Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh dan mendeskripsikan isolat rhizobakteri dari lahan pertanian organik Desa Batur Kabupaten Semarang serta menguji isolat rhizobakteri tersebut secara in vitro untuk mengendalikan pertumbuhan patogen jamur *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici*.

METODOLOGI

Tempat dan Waktu Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Pisau/cutter, kantong plastik, termometer tanah, higrometer, pH

meter tanah, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, cawan petri, bunsen, *autoclave*, jarum ose, spatula, tabung reaksi, timbangan analitik, mikropipet, mikrotip, bunsen, rak tabung reaksi, penangas air, *shaker*, vortek, batang pengaduk, gelas benda, rak pengecatan, kaca obyek, gelas penutup, mikroskop, minyak emersi, inkubator, *Laminar air flow* (LAF), *mikrocentrifuge*, mikro pipet, tabung ependorf, *freezer*, DNA *master cycler* (PCR) (Mini cycler TM, MJ Research Inc, Watertown, MA, USA), peralatan elektroforesis, nano drop dan gel doc.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel tanah rhizosfer tanaman cabai rawit perkebunan sayuran organik di Desa Batur Kabupaten Semarang, *tryptic soy agar* (TSA), aquades, alkohol, pewarna gram, kertas saring, isolat jamur patogen *Fusarium oxysporum* F.sp. *capsici* dari Laboratorim Biopestisida FMIPA Udayana Bali, *Potato Dextrosa agar* (PDA), *Tauge Extract Broth* (TEB), H₂O₂ (Hidrogen peroksida), *malachite green*, minyak imersi, chelex 10%, primer 27F dan 1492R, DNA marker, KIT Promega Go Tax^R Green Master Mix 2X, agarosa, buffer TAE 1 x, ethidium bromida, loading dye.

Cara Kerja

a. Sampling Tanah

Sampel tanah tanaman cabai rawit diperoleh dari perkebunan sayuran organik kelompok tani Tranggulasi Desa Batur, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang Provinsi Jawa Tengah. Pengukuran mikroklimat (temperatur, kelembapan udara, pH tanah dan ketinggian) dilakukan saat sampling untuk mengetahui karakteristik lingkungan sampel.

b. Isolasi dan Pemurnian Isolat Rhizobakteri

Sebanyak 10 gram tanah di sekitar daerah perakaran tanaman cabai rawit dan butiran tanah yang melekat di permukaan akar dimasukkan kedalam labu erlenmeyer berisi 90 ml akuades steril (pengenceran

10⁻¹) dan dikocok dengan *rotary shaker* kecepatan 150 rpm selama 30 menit hingga homogen. Suspensi pada pengenceran 10⁻¹ dipanaskan pada suhu 80 °C selama 30 menit untuk mengisolasi bakteri kelompok *Bacillus* sp.(Widodo,2000). Suspensi kemudian diencerkan menjadi 10⁻²-10⁻⁶ dan dari setiap tahapan pengenceran dihomogenkan dengan vortex. Suspensi pada pengenceran 10⁻⁴ -10⁻⁶ di ambil 1 ml menggunakan pipet steril dan disebarkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium TSA, kemudian diratakan menggunakan spreader hingga rata. Perlakuan diulang 2 kali. Cawan petri tersebut dibungkus dengan kertas pembungkus dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam.

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode goresan (*streak method*). Koloni-koloni bakteri yang menampakkan morfologi dan warna yang berbeda diambil. Masing-masing koloni bakteri tersebut digoreskan pada permukaan media TSA steril pada masing-masing cawan petri yang telah disiapkan. Cawan petri tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam dan diamati pertumbuhannya, apakah sudah terpisah dan menjadi kultur murni atau belum. Apabila masih terdapat campuran bakteri pada cawan petri tersebut, maka dilakukan pemisahan kembali dengan metode goresan hingga diperoleh kultur murni pada masing-masing cawan petri. Kultur murni dari isolat rhizobakteri tersebut dipindahkan dalam medium agar miring TSA pada tabung reaksi dengan teknik goresan.

c. Identifikasi Isolat Rhizobakteri yang Memiliki Aktivitas Anti jamur

c.1 Morfologi

Pewarnaan Gram

Semua isolat yang diperoleh dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan membersihkan gelas benda menggunakan alkohol, kemudian dipanaskan diatas nyala bunsen. Preparat apusan bakteri dibuat dengan

mengambil secara aseptik 1 ose suspensi biakan bakteri potensial lalu diratakan di atas permukaan gelas benda kira-kira 1 cm² dan dilewatkan di atas nyala bunsen. Preparat apusan bakteri, kemudian ditetesi dengan cat Gram A secara merata sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Preparat yang dibuat, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Gelas benda ditetesi dengan larutan mordan Gram B, dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Preparat, selanjutnya dicuci dengan peluntur (Gram C) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat apusan bakteri kemudian diberi larutan cat penutup (Gram D), dibiarkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Gelas benda diamati dengan mikroskop perbesaran kuat menggunakan minyak emersi. Bakteri gram positif berwarna ungu (violet), sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah

d. Uji Daya Hambat Rhizobakteri terhadap *Fusarium oxysporum* F.sp. *capsici*

Uji daya hambat dilakukan menggunakan metode kultur ganda Anjaih *et al.*, (1998). Metode ini dilakukan dengan menggoreskan isolat rhizobakteri pada medium PDA dalam cawan petri berdiameter 9 cm. Goresan rhizobakteri tersebut sepanjang 3 cm dan berjarak 3 cm dari potongan isolat jamur *F.oxysporum* f.sp. *capsici* sebesar 0,5 cm² yang di letakkan pada tengah cawan petri. Kultur dan biakan rhizobakteri diinkubasi selama 7 hari dan diamati pertumbuhannya. Adanya interaksi antagonis ditandai dengan terbentuknya zona bening antara isolat rhizobakteri dan kultur *F.oxysporum* f.sp. *capsici*. Kontrol di buat dengan mengkultur jamur tanpa isolat rhizobakteri.

Besarnya persentase penghambatan dihitung menggunakan rumus $1-(a/b) \times 100 \%$, dimana a menunjukkan jarak antara titik pusat cendawan ke arah isolat

rhizobakteri, b merupakan jarak antara titik pusat cendawan ke daerah kosong tanpa isolat rhizobakteri (Dikin *et al.*, 2006). Penentuan kategori kemampuan antagonisme dikelompokkan menjadi empat kategori berdasarkan persentase zona penghambatan yaitu kuat (> 40%) dengan simbol +++ ; sedang (40%<x>30%) dengan simbol ++ ; lemah (<30%) dengan simbol + dan tidak memiliki kemampuan antagonis (0%) dengan simbol -.

e. Uji Anti Jamur oleh Rhizobakteri dengan Metode Biomassa

Uji biomassa dilakukan menggunakan metode Mahartha *et al.*, (2013) dengan modifikasi berupa penggunaan medium TEB. Metode ini dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat rhizobakteri kemudian dikultur pada media cair TEB sebanyak 10 ml pada tabung reaksi selama 24 jam. Tahapan selanjutnya 1 ml inokulum rhizobakteri tersebut diinokulasikan kedalam media cair TEB sebanyak 100 ml. Jamur *F.oxysporum* f.sp. *capsici* kemudian dimasukkan pada medium TEB 100 ml tersebut sebanyak 1 potongan ukuran 0,5 cm² yang diambil dari kultur murni jamur *F.oxysporum* f.sp. *capsici* umur 5 hari. Perlakuan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 7 hari untuk melihat aktivitas rhizobakteri menghambat jamur. Biomassa jamur disaring menggunakan kertas saring yang telah ditimbang untuk mengetahui berat awalnya. Kertas saring kemudian dikeringkan dalam oven suhu 50 °C selama 24 jam. Biomassa jamur ditimbang dengan mengurangi berat akhir dengan berat awal kertas saring untuk mengetahui berat biomassa jamur. Kontrol di buat dengan perlakuan sama, tanpa memasukkan rhizobakteri pada medium TEB.

f. Karakterisasi Molekuler Isolat Rhizobakteri Potensial

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Chelex (Walsh *et al.*, 1991). Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan 3 ose kultur bakteri umur 24 jam ke dalam mikrotube yang telah diberi 100 ul ddH₂O secara aseptis. Suspensi ditambahkan 1 ml saponin 0,5 % yang diencerkan dalam *Phospat Buffer Saline* (PBS) 1x, kemudian sampel disimpan pada suhu 4^o C selama 24 jam. Sampel kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang terbentuk kemudian ditambah ddH₂O sebanyak 100 ul dan ditambah 50 ul 20% chelex 100 secara berurutan. Sampel kemudian dipanaskan pada suhu 100^o C selama 10 menit, dimana setiap 5 menit sampel divorteks. Sampel kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, supernatan yang terbentuk merupakan genom DNA. Supernatan tersebut kemudian dipindahkan pada mikrotube baru, kemudian diukur konsentrasi dan kemurnian DNA tersebut menggunakan *nano drop*.

Amplifikasi Gen 16S rRNA Menggunakan PCR

DNA yang menyandikan gen 16S rRNA dari isolat potensial di amplifikasi dengan primer hulu 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer hilir 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), primer ini mengamplifikasi sekitar 1460 bp konsensus gen 16S rRNA yang bersifat umum untuk domain bakteri (Long dan Azam, 2001). Reaksi PCR dibuat dalam volume total 50 µl. Campuran reaksi mengandung 1,5 ul primer universal 27F; 1,5 ul primer 1492R ; 3 ul DNA template ; 25 ul KIT Promega Go Tax^R Green Master Mix 2X (DNA Taq Polymerase; Reaction Buffer pH 8,5; dNTP 400 uM; 3 mM MgCl₂) dan 19 ul ddH₂O.

Proses PCR dilakukan dalam mesin DNA *thermal cycler* (Mini cycler TM, MJ Research Inc, Watertown, MA, USA) terdiri dari pra-denaturasi yaitu

memanaskan DNA supaya untai ganda DNA terpisah pada 95^o C selama 3 menit, kemudian diatur 30 siklus (denaturasi pada 95^o C selama 1 menit, annealing pada 55^o C selama 1 menit, dan extension pada 72^o C selama 1 menit), dilanjutkan final extension pada 72^o C selama 7 menit dan terakhir 4^o C selama 3 menit (Lee *et al.*, 2006). Untuk mengetahui ukuran fragmen, DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada agarose 1% dalam bufer *Tris base Acetic acid* EDTA (TAE) pada 100V selama 30 menit. Visualisasi produk PCR 16S rRNA dilakukan menggunakan analisis elektroforesis dengan cara memasukkan 5 ul produk PCR ke dalam sumuran gel agarose 1 % yang telah dicampur ethidium bromida dan telah direndam larutan buffer TAE 1 x, gel kemudian dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 V selama 30 menit. Gel kemudian di visualisasi menggunakan *gel doc* untuk mengetahui hasil PCR tersebut.

Penentuan Urutan Nukleotida 16S rRNA (Sekuensing)

Produk PCR yang diperoleh dikirimkan ke PT. Genetika Science (Jakarta, Indonesia) untuk penentuan sekuens 16S rRNA.

Analisis sekuens

Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan menyejajarkan urutan nukleotida dengan sekuens yang terdapat dalam *gen bank*. Hasil sekuens diujarkan dengan data dari Gen Bank menggunakan program Blast-N (*Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide*) dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Kekerabatan filogenetik sekuens gen 16S rRNA disejajarkan menggunakan program Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/), kemudian dianalisis dengan metode *neighbour-joining* melalui program MEGA versi 5 (Tamura *et al.*, 2007). Kekasaran inferensi pohon filogeni dievaluasi dengan 100 *bootstrap*.

g. Karakterisasi Aktivitas Biokimia

Karakterisasi aktivitas biokimia dilakukan sebagai tahap konfirmasi dari identifikasi molekuler yang telah didapatkan. Pengujiannya sebagai berikut:

Uji motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menanamkan biakan bakteri pada media TSA semi solid dengan cara tusuk (*stab inoculation*) sedalam 3 cm, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1x24 jam. Hasil positif (motil) ditunjukkan jika bakteri tumbuh pada seluruh permukaan media yang semi solid, hasil negatif ditunjukkan jika bakteri hanya tumbuh pada daerah tusukan saja.

Pengamatan Endospora Rhizobakteri

Pengujian pembentukan endospora dilakukan untuk mengetahui keberadaan endospora pada sel bakteri. Satu lup suspensi bakteri dicampurkan dengan akuades steril, diteteskan pada gelas obyek dan dikeringanginkan, lalu ditetesi dengan larutan gram A (*Crystal violet*) dan didiamkan selama 10 menit hingga mengering. Gelas obyek tersebut dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan di atas bunsen. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya, sel bakteri terlihat ungu (violet), sedangkan endospora terlihat bening.

Uji Katalase

Koloni rhizobakteri diambil dari media TSA diambil sebanyak satu ose, kemudian digoreskan di atas kaca objek yang kering. Hidrogen peroksida diteteskan 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 bakteri ditanam dengan metode goresan pada medium agar

pati (lampiran 1.2). Kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Larutan lugol diteteskan 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 bakteri diinokulasikan ke dalam medium glukosa cair fenol merah, arabinosa cair fenol merah, dan Manitol cair fenol merah (pada tabung durham). Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar. Perubahan yang terjadi diamati dan dicatat. Uji fermentasi karbohidrat positif jika warna merah medium fermentasi berubah menjadi kuning (bakteri melakukan fermentasi gula dan menghasilkan asam). Gelembung yang terdapat dalam tabung durham menunjukkan bahwa fermentasi juga menghasilkan gas karbondioksida (CO₂).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi rhizobakteri dari rhizosfer tanaman cabai rawit (*Capsicum frutescens* Linn.) di lahan pertanian organik Desa Batur Kecamatan Getasan Kabupaten Semarang. Sampling dilakukan pada tanggal 2 Maret 2014. Tanah diambil dari daerah sekitar akar pada jarak 2 cm dan dari tanah yang menempel pada akar (Gambar 4.1). Sampel tanah merupakan kombinasi yang diambil dari 3 ladang yang berbeda pada kawasan pertanian cabai rawit di daerah tersebut. Hal ini dilakukan untuk memperoleh jenis bakteri yang beragam.

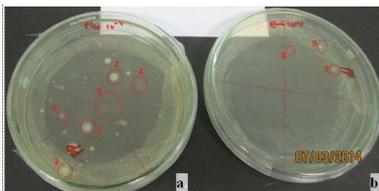
Tabel 4.1 Merupakan kondisi mikroklimat tanah sekitar akar tanaman cabai rawit (*C. frutescens* Linn.). Kondisi mikroklimat tempat tersebut diketahui memiliki rata-rata temperatur 17,6 °C dan kelembapan sebesar 72 %. Kondisi pH tanah sebesar 6,87 menunjukkan bakteri yang hidup pada tanah di wilayah tersebut

cenderung kelompok bakteri yang hidup pada kondisi pH netral.

Tabel 4.1 Kondisi mikroklimat tanah lahan pertanian organik tanaman cabai rawit (*C.frutescens* Linn.)

Ladang	Jenis Tanah	pH	Temperatur (°C)	Kelembapan (%)	Ketinggian (mdpl)
1	Humus	6,90	18	72	1690
2	Humus	6,90	18	72	1690
3	Humus	6,80	17	72	1690
Rata-rata	Humus	6,87	17,6	72	1690

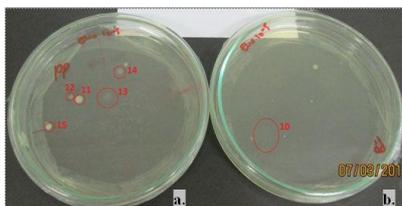
Gambar 4.2, 4.3 dan 4.4 merupakan hasil isolasi rhizobakteri pada pengenceran 10^{-4} – 10^{-6} , sedangkan Tabel 4.2 menunjukkan karakter morfologi koloni meliputi bentuk koloni, warna, ukuran, karakteristik optik, tepian, elevasi, permukaan dan bentuk sel. Gambar 4.5 merupakan hasil pengecatan gram sel rhizobakteri tersebut.



Gambar 4.2 Hasil pengkulturan sampel rhizobakteri pada pengenceran 10^{-4} (a. Ulangan 1 ; b. ulangan 2) inkubasi 48 jam suhu 27°C

*Keterangan:

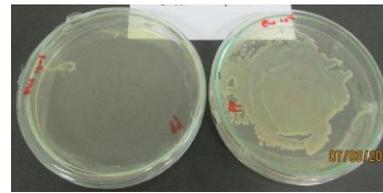
1: Isolat E₁ ; 2:Isolat E₂ ; 3:Isolat E₃ ;
4:Isolat E₄ ; 5:Isolat E₅ ; 6:Isolat E₆ ;
7:Isolat E₇ ; 8:Isolat E₈ ; 9:Isolat E₉



Gambar 4.3 Hasil pengkulturan sampel rhizobakteri pada pengenceran 10^{-5} (a. Ulangan 1 ; b. ulangan 2) inkubasi 48 jam suhu 27°C

*Keterangan :

10: Isolat E₁₀ ; 11:Isolat E₁₁ ; 12:Isolat E₁₂
; 13:Isolat E₁₃ ; 14:Isolat E₁₄ ; 15:Isolat E₁₅



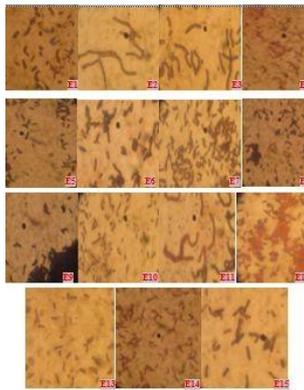
Gambar 4.4 Hasil pengkulturan sampel rhizobakteri pada pengenceran 10^{-6} (a. Ulangan 1 ; b. ulangan 2) inkubasi 48 jam suhu 27°C

Gambar 4.2 menunjukkan isolat yang diperoleh pada pengenceran 10^{-4} sebanyak 9 isolat (E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆, E₇, E₈, E₉), sedangkan pada gambar 4.3 diketahui pada pengenceran 10^{-5} didapatkan 6 isolat (E₁₀, E₁₁, E₁₂, E₁₃, E₁₄, E₁₅). Pada pengenceran 10^{-6} tidak didapatkan isolat bakteri, sedangkan pada pengulangan ke-2 dimungkinkan terdapat bakteri kontaminan. Total isolat yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 15 isolat rhizobakteri.

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa dari segi bentuk koloni secara umum memiliki kesamaan yaitu berbentuk *circular*, kecuali isolat E₄, E₅, E₁₀ dan E₁₃ yang berbentuk *irregular*. Apabila dilihat dari segi tepian, elevasi dan permukaan isolat isolat E₁, E₂, E₃, E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₁, E₁₂, E₁₄ dan E₁₅ memiliki tepian *entire*, elevasi *raised* dan permukaan mengkilap, kecuali isolat E₄, E₅, E₁₀ dan E₁₃ yang memiliki tepian *undulate*, elevasi *flat* dan permukaan tidak mengkilap. Secara umum Isolat yang diperoleh memiliki karakteristik optik *opaque*, isolat E₄, E₅ dan E₁₃ memiliki karakteristik optik *translucent* dan hanya isolat E₁₀ yang memiliki karakteristik optik *transparent*. Seluruh isolat memiliki warna dan ukuran koloni yang beragam.

Gambar 4.5 memperlihatkan reaksi pewarnaan gram, bentuk serta ukuran sel rhizobakteri. Secara umum isolat rhizobakteri yang diperoleh memiliki bentuk sel basil dimana isolat E₁, E₄, E₅, E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₂, E₁₃, E₁₄ dan E₁₅ tergolong basil tunggal, sedangkan isolat E₂, E₁₁ tergolong streptobasil dan E₃ tergolong diplobasil. Semua isolat yang

diperoleh tergolong dalam bakteri gram positif dan ukuran sel yang bervariasi.



Gambar 4.5. Morfologi sel isolat rhizobakteri tanaman cabai (*C.frustescens* Linn.) perbesaran 1000 X.

Berdasarkan Gambar 4.5 diketahui bahwa mayoritas bakteri yang berhasil diisolasi memiliki bentuk basil dan tergolong gram positif. Hasil ini sesuai dengan yang diharapkan, dimana metode isolasi bakteri dengan cara pemanasan suspensi pada pengenceran 10^{-1} pada temperatur 80°C selama 30 menit bertujuan untuk mendapatkan kelompok bakteri *Bacillus* sp. Menurut Widodo (2000), kelompok bakteri *Bacillus* sp. mampu membentuk endospora yang dapat bertahan pada temperatur 80°C . Bai *et al.* (2003) mengungkapkan bahwa kemampuan dalam membentuk endospora menjadikan kelompok *Bacillus* sp. banyak digunakan dalam industri secara komersial sebagai pupuk hayati karena dapat bertahan lama dan beradaptasi dengan formula dan bahan-bahan kimia yang diaplikasikan dalam tanah pertanian. Selain itu kemampuannya membentuk endospora juga membuat kelompok bakteri ini mampu bertahan pada lahan kritis, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai PGPR baik sebagai biopestisida atau pemacu pertumbuhan tanaman.

Uji antagonisme dilakukan menggunakan 2 metode yaitu metode uji kultur ganda (Anjaiah *et al.*,1998) dan metode uji biomassa (Mahartha *et al.*,2013). Semua isolat di uji kultur ganda

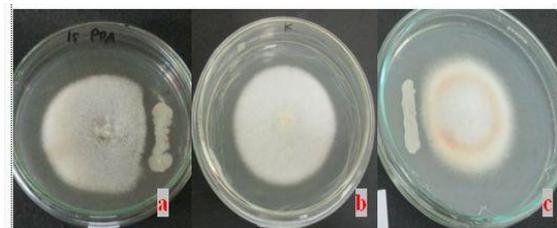
sebagai skrining awal. Uji biomassa hanya dilakukan pada isolat potensial (E_1 , E_{15}) dan tidak potensial (E_{11} , E_{12}) berdasarkan skrining awal. Uji biomassa ini dilakukan sebagai pembanding hasil uji kultur ganda. Kedua uji anti jamur ini dilakukan menggunakan kontrol negatif berupa isolat jamur tanpa perlakuan rhizobakteri.

Tabel 4.3 Hasil uji kultur ganda Rhizobakteri tanaman cabai rawit (*C.frustescens* Linn.)

Isolat	Ulangan 1 (cm)		Ulangan 2 (cm)		Rata-rata (cm)		Parameter		
	a	b	a	b	a	b	Presentase (1-(a/b)x100)%	Kemampuan anti jamur	Lebar zona hambat (cm)
E ₁	2,8	2,7	2,7	2,6	2,75	2,65	3,77 %	(+)	0,1
E ₂	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	0	(-)	0
E ₃	2,7	2,7	2,7	2,6	2,7	2,65	1,88 %	(+)	0,05
E ₄	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₅	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	0	(-)	0
E ₆	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	0	(-)	0
E ₇	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	0	(-)	0
E ₈	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₉	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₁₀	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₁₁	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	0	(-)	0
E ₁₂	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₁₃	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₁₄	3	3	3	3	3	3	0	(-)	0
E ₁₅	2,7	2,1	2,7	2,3	2,7	2,2	22 %	(+)	0,5

*Keterangan:

- jarak dari titik pusat koloni jamur ke tepi koloni bakteri yang saling kontak.
- jarak dari titik pusat koloni jamur ke tepi koloni jamur yang saling kontak dengan koloni.



Gambar 4.6. Hasil uji kultur ganda isolat E₁₅, inkubasi 7 hari suhu 27°C (a. Ulangan 1 ; b. kontrol *F.oxysporum* f.sp *capsici* umur 7 hari ; c ulangan 2).

Kemampuan antagonis rhizobakteri terhadap jamur patogen *F.oxysporum* f.sp *capsici* diukur secara kualitatif dan kuantitatif. Pertumbuhan jamur terhenti

dan menebal saat mendekati isolat yang berpotensi sehingga terbentuk area yang memisahkan antara cendawan dengan bakteri berupa zona hambat. Semakin besar zona hambat yang terbentuk, maka kemampuan isolat tersebut menghasilkan senyawa anti jamur semakin banyak dan isolat tersebut semakin berpotensi untuk dijadikan sebagai agen anti jamur. Berdasarkan hasil pengamatan uji kultur ganda (Tabel 4.3), hanya 3 isolat yang memiliki kemampuan antagonis terhadap jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici* yakni isolat E₁, E₃ dan E₁₅. Lebar zona hambat terkecil ditunjukkan isolat E₃ sebesar 0,05 cm, isolat E₁ menunjukkan lebar zona hambat sebesar 0,1 cm. Isolat E₁₅ memiliki kemampuan antagonis terkuat dengan membentuk zona hambat rata-rata sebesar 0,5 cm.

Besarnya persentase daya hambat rhizobakteri terhadap jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici* mengakibatkan kecilnya luas koloni jamur saat uji. Berdasarkan perhitungan persentase daya hambat (Tabel 4.3), menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata terhadap persentase daya hambat rhizobakteri. Isolat E₁ mampu menghambat pertumbuhan jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici* dengan persentase sebesar 3,77 %, isolat E₃ sebesar 1,88 % dan isolat E₁₅ sebesar 22%, sedangkan isolat lainnya tidak memiliki kemampuan penghambatan.

Ketiga isolat tersebut memiliki kategori penghambatan yang lemah karena memiliki persentase penghambatan < 30% (Dikin et al, 2006), namun menurut Susilowati (2011) isolat yang memiliki persentase penghambatan terhadap jamur patogen lebih dari 20% saat uji *in vitro* sudah cukup sebagai kandidat biokontrol yang baik. Maka isolat E₁₅ berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol terhadap jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici* dengan melalui tahapan uji lanjut. Isolat E₁, E₁₅ sebagai isolat positif dan isolat E₁₁ dan E₁₂ sebagai isolat negatif selanjutnya dilakukan uji biomassa untuk

membandingkan dengan hasil uji kultur ganda.

Tabel 4.4 Hasil Uji biomassa rhizobakteri terhadap jamur patogen *F.oxysporum* f.sp *capsici*

Isolat	Biomassa jamur patogen (g)
Kontrol	0,1900
1	0,1236
15	0,0386
11	0,0906
12	0,1890

*keterangan: inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu 27 °C dengan kontrol tanpa perlakuan rhizobakteri.

Jumlah inokulum yang digunakan pada uji biomassa, isolat E₁ sebesar 2,20 x 10¹⁰ CFU/ml, isolat E₁₅ 1,80 x 10¹⁰ CFU/ml, isolat E₁₁ 6,9 x 10⁹ CFU/ml dan isolat E₁₂ 3,4 x 10⁹ CFU/ml. Hasil uji pengaruh rhizobakteri terhadap biomassa jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici* ditunjukkan oleh berat biomassa jamur. Semakin rendah biomassa jamur setelah uji maka kemampuan rhizobakteri menghambat pertumbuhan jamur semakin baik. Berdasarkan Tabel 4.4 diketahui isolat E₁₅ efektif menekan pertumbuhan biomassa jamur dengan berat jamur terendah sebesar 0,0386 gram dibanding kontrol. Hasil uji biomassa sesuai dengan hasil uji kultur ganda yang menunjukkan isolat E₁₅ mampu menekan pertumbuhan jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici* paling baik.

Adanya rhizobakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan koloni jamur *F.oxysporum* f.sp *capsici*. secara *in vitro*. Kemampuan suatu agens hayati khususnya rhizobakteri dalam menekan patogen dimungkinkan melibatkan satu atau beberapa mekanisme penghambatan. Menurut Fernando et al., (2005), mekanisme penghambatan mikroba antagonis terhadap jamur patogen adalah dengan menghasilkan antibiotik, toksin, kompetisi ruang dan nutrisi, menghasilkan siderofor, enzim ekstraselular dan

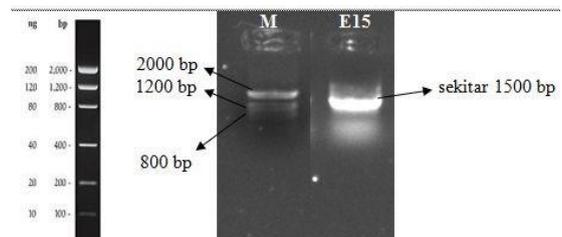
hidrogen sianida (HCN). Menurut Madigan *et al.*, (2000), beberapa anggota genus *Bacillus* sp. memiliki kemampuan untuk mensintesis antibiotik dan protein antara lain basitrasin, mycobacilin, zwittermicin, subtilisin (pada *B.subtilis*) dan pumilin (pada *B.Pumilis*). Lim *et al.*, (1991) juga melaporkan bahwa penghambatan biokontrol terhadap jamur patogen dapat terjadi melalui mikolisis yakni hilangnya protoplasma dan enzim tidak larut pada dinding sel jamur yang berakibat pertumbuhan hifa terhambat.

Metode uji daya hambat isolat rhizobakteri terhadap jamur patogen merupakan salah satu metode seleksi awal secara *in vitro* untuk menentukan isolat rhizobakteri yang berpotensi sebagai agens pengendali jamur patogen. Uji lanjut secara *in vivo* dan terhadap karakter fisiologi serta karakter biokimiawi yang berhubungan dengan kemampuan sebagai agen antagonis penting dilakukan seperti sekresi enzim ekstraselular (kitinase, protease dan selulase), produksi senyawa HCN, produksi siderofor, atau yang berhubungan sebagai pemacu pertumbuhan seperti pelarutan fosfat, fiksasi nitrogen dan produksi hormon tumbuh asam indol asetat (IAA).

Bakteri yang memiliki kemampuan sebagai anti jamur dengan zona hambat paling kuat, dalam hal ini isolat E15 selanjutnya di karakterisasi secara molekuler dan aktivitas biokimia untuk mengetahui identitas bakteri tersebut. Karakterisasi molekuler diawali dengan isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode Chelex (Walsh *et al.*, 1991) dan diperoleh DNA genom dengan konsentrasi 516,7 ng/ul. DNA genom selanjutnya diamplifikasi menggunakan reaksi PCR (Lee *et al.*, 2006) untuk menggandakan sekuen gen 16S rRNA dengan menggunakan primer universal 27F dan 1492R (Long dan azzam, 2001). Menurut Yuwono (2006) reaksi PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial

suatu sekuen nukleotid tertentu dengan cara *in vitro*.

Sekuen gen 16S rRNA adalah sekuen yang memiliki panjang sekitar 1.550 bp dan mempunyai daerah yang terkonservasi serta daerah yang variabel, dimana gen ini cukup besar dengan polimorfisme antar spesies sehingga dapat digunakan sebagai alat untuk membedakan antar spesies (Woese, 2006). Gen 16S rRNA memiliki daerah-daerah berbeda berupa sekuen yang konservatif dan sekuen lainnya yang sangat variabel dan terdapat pada semua prokariot (Bottger, 1996). Sekuen basa nukleotida yang mengkode gen 16S rRNA merupakan standar yang penting untuk identifikasi bakteri. Bakteri yang berbeda mempunyai sekuen 16S rRNA tertentu. Identifikasi didasarkan pada sekuen yang paling cocok dari bakteri yang akan diidentifikasi dengan semua sekuen gen 16S rRNA yang telah diketahui di pusat data *Gen Bank*.



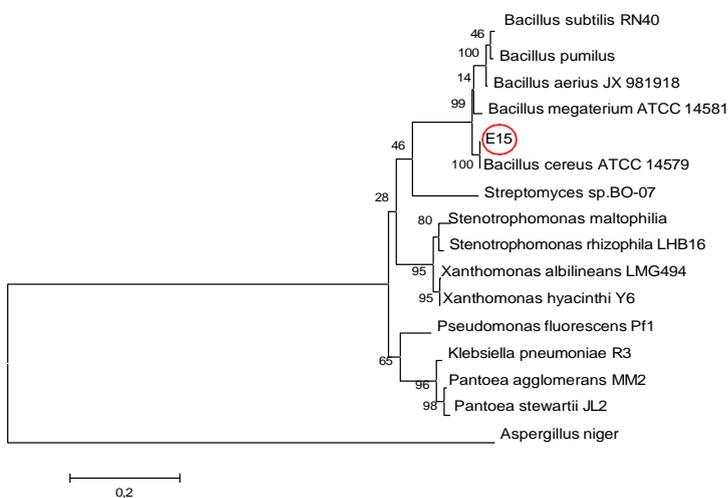
Gambar 4.7 Visualisasi hasil amplifikasi sekuen 16S rRNA isolat E15 pada konsentrasi gel agarosa 1 % (M=marker ; E15=isolat E15)

Gambar 4.7 menunjukkan hasil elektroforesis produk PCR dari isolat E15 yang di visualisasi menggunakan *gel doc* dan diperoleh pita DNA berukuran sekitar 1500 bp. Produk PCR tersebut selanjutnya di *sequencing* untuk memperoleh urutan susunan basa. Hasil *sequencing* diperoleh sekuen parsial primer 27F dengan panjang basa nukleotid 1492.

Analisis homologi dari sekuen diatas dilakukan menggunakan program BLAST-N dan diperoleh homologi sebesar 97% dan gap 1% dengan spesies *Bacillus cereus*

strain ATCC 14579 nomor akses NR 074540.1 (Gambar 4.9). *Sequencing* menggunakan 16S rRNA dapat menghasilkan panjang urutan basa minimal 500 sekuen, idealnya memiliki 1500 sekuen dengan gap <1% (Janda & abbott, 2007). Drancourt *et al.*, (2000) menyatakan bahwa identifikasi pada tingkat spesies ditetapkan dari similaritas sekuen gen 16S rRNA 99% dengan sekuen yang ada pada GenBank, sedangkan identifikasi pada tingkat genus dengan similaritas 97% dan untuk identifikasi genus baru ditetapkan dengan similaritas yang lebih rendah dari 97%.

Gambar 4.10 menunjukkan dendrogram pohon filogenetik hasil pengolahan sekuen gen 16S rRNA isolat E₁₅ menggunakan program Njplot dan MEGA 5.0. Pohon filogenetik tersebut memperlihatkan hubungan kekerabatan antara isolat E₁₅ dengan spesies *Bacillus* sp. dan spesies bakteri lain yang terbukti memiliki kemampuan PGPR baik sebagai anti patogen atau pemacu pertumbuhan tanaman.



Gambar 4.10. Pohon filogenetik berdasarkan perbandingan sekuen gen 16S rRNA menggunakan analisis *Neighbor-joining* dan program MEGA 4.0 dengan *bootstrap* 100. *Aspergillus niger* digunakan sebagai *out group*

Gambar 4.10 merupakan pohon filogenetik yang menunjukkan isolat E₁₅ berkerabat dekat dengan spesies bakteri *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 dengan nilai *bootstrap* 100. Menurut Dharmayanti (2011) nilai *bootstrap* merupakan nilai yang menentukan kestabilan pohon filogenetik, semakin tinggi nilai *bootstrap* maka pengelompokan dalam pohon filogenetiknya semakin stabil. Pohon filogenetik tersebut membentuk tiga kelompok hubungan kekerabatan, dimana spesies yang berada dalam kelompok yang sama mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat. Isolat E₁₅ berada satu kelompok dengan galur biokontrol yakni *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* dengan hubungan kekerabatan yang dekat dan nilai *bootstrap* 99 sehingga diperkirakan isolat E₁₅ mempunyai sifat-sifat yang identik yaitu sifat sebagai bakteri biokontrol.

B. subtilis diketahui mampu memproduksi berbagai macam zat antimikroba, spesies ini dapat memproduksi lebih dari 24 jenis antibiotik dengan berbagai struktur dan bakteriosin. Bakteriosin yang banyak diproduksi oleh *B. subtilis* adalah subtilin, ericin, mersacidin, sublancin, dan subtilosin A (Stein et al., 2004). *B. pumilus* dilaporkan mampu mensintesis pumilin yang mampu menghambat pertumbuhan patogen (Madigan *et al.*, 2000). *B. megaterium* juga dilaporkan antagonis terhadap empat jamur patogen seperti seperti *Fusarium lamaroensis*, *P. hypobrumea*, *S. repens*, dan *S. rolfsii* (Chakraborty *et al.*, 2006).

B. cereus galur UW85 dilaporkan mampu menghasilkan dua jenis antibiotik yang dapat dijadikan agen biokontrol penyakit yang disebabkan oleh jamur patogen *Phytophthora* sp. dan pembusukan akar oleh jamur *Fusarium* sp. pada tanaman kedelai. Spesies *B. cereus* juga diketahui mampu mensintesis enzim kitinase yang menghambat pertumbuhan miselium jamur patogen (Huang *et al.*, 2005). Berdasarkan analisis hubungan

kekerabatan dimungkinkan isolat potensial E₁₅ memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol dengan mekanisme yang identik dengan kelompok *Bacillus* sp. terutama jenis *B. cereus* dengan mensintesis antibiotik atau enzim kitinase yang berperan menghambat pertumbuhan miselium jamur patogen.

Berdasarkan analisis hasil sekuen gen 16S rRNA dan pohon filogenetik diketahui isolat E₁₅ yang memiliki aktivitas anti jamur identik dengan spesies *B. cereus* strain ATCC 14579 kemiripan 97% dan nilai bootstrap 100 pada pohon filogenetik. Hal ini memungkinkan kemiripan sifat keduanya sebagai agen biokontrol. Berikut taksonomi *B. cereus* strain ATCC 14579 menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th editions dalam Hadioetomo (1985):

Kingdom	: <i>Prokaryotae</i>
Divisi	: <i>Bacteria</i>
Kelas	: <i>Schizomycetes</i>
Ordo	: <i>Eubacteriales</i>
Famili	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i> sp.
Spesies	: <i>Bacillus cereus</i>

Isolat potensial yakni E₁₅ selanjutnya di karakterisasi aktivitas biokimia untuk mengkonfirmasi hasil identifikasi molekuler. Karakterisasi biokimia dilakukan berdasarkan Buchanan & Gibbons (1974), berikut hasil karakterisasi tersebut:

Tabel 4.5 Karakteristik biokimia isolat E₁₅ dibandingkan spesies *B. cereus*.

Karakteristik yang diamati	Sifat E ₁₅	<i>B. cereus</i>
Pewarnaan gram	+	+
Motilitas	+	+
Uji Katalase	+	+
Spora		
• Bentuk	*E	*E
• Posisi dominan	T	T
Hidrolisis pati	+	+
Fermentasi karbohidrat		
• Glukosa	+	+
• Manitol	-	-
• Arabinosa	-	-

Keterangan : Tanda + menunjukkan hasil uji positif
Tanda – menunjukkan hasil uji negatif
*E = Elips atau silinder
T = Terminal (Ujung)

Tabel 4.5 menunjukkan isolat E₁₅ memiliki sifat biokimiawi yang identik dengan *B. cereus*. Bakteri ini merupakan gram positif yang memiliki bentuk batang tunggal. Bakteri ini bersifat motil dan memiliki endospora berbentuk elips atau silinder dengan letak di terminal serta mampu mengurai H₂O₂ karena memiliki enzim katalase. Kemampuan isolat E₁₅ dalam menghidrolisis pati menunjukkan isolat ini mampu mengubah polisakarida menjadi sakarida yang lebih sederhana menggunakan enzim amilase. Uji fermentasi glukosa positif menunjukkan kemampuan isolat E₁₅ dalam melakukan fermentasi karbohidrat yang menghasilkan produk akhir berupa asam, sedangkan untuk uji fermentasi arabinosa dan manitol keduanya menunjukkan hasil yang negatif.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengisolasi rhizobakteri sebanyak 15 isolat dengan karakteristik beragam namun secara umum bakteri tersebut memiliki bentuk bacil dan tergolong bakteri gram positif. Isolat E₁₅ memiliki kemampuan terbaik dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici* secara *in vitro* melalui uji kultur ganda dengan penghambatan sebesar 22% dan uji biomassa dengan berat biomassa jamur terkecil yakni 0,0386 gram. Isolat E₁₅ tersebut berdasarkan identifikasi molekuler identik dengan spesies *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 dengan kemiripan 97% dan memiliki karakteristik biokimiawi identik dengan spesies *Bacillus cereus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anjaiah V, Koedam N, Nawak-Thompson B, Loper JE, Höfte M, Tambong JT, Cornelis P. 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium spp* and *Pythium spp*. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 847-854.
- A'yun K Q, T Hadiastono, M Martosudiro. 2013. Pengaruh penggunaan PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) terhadap intensitas TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), pertumbuhan, dan produksi padatan amcabairawit (*Capsicum frutescens* L.). *Jurnal HPT* 1 (1): 47-56.
- Bai, Y., X. Zhou, and D.L. Smith. 2003. Enhanced Soybean Plant Growth Resulting from Coinoculation of *Bacillus* sp. Strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci* 43 : 1774-1781.
- Bakker P.A.H.M dan Van Loon, L.C.. 2003. Signalling in Rhizobacteria-Plant interactions. In: De Kroon H, Visser EJW (eds) Root ecology. *Ecological Studies*, 168: 297-330.
- Buchanan ER, Gibbon NE. 1974. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore : Williams and Welkins Co.
- Chakraborty U, B Chakraborty, M Basnet. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Cameliasinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal. Basic Microbiology*. 46 (3): 186-195.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Cle'Ment, dan E. D. A. Barka. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 4951-4959.
- Dharmayanti I. 2011. Filogenetika Molekular : Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Makalah*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor.
- Dikin A, Sijam K, Kadir J, Seman IA. 2006. Antagonistic bacteria against *Schizophyllum commune* FR. in Peninsular Malaysia. *Biotropia* 13:111-121.
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38: 3623-3630.
- Fakamizo, T., Honda, Y., Toyoda, H., Ouchi, S. & Goto, S. 1996. Chitinous component of cell wall of *Fusarium oxysporum*, its structure deduced from chitosanase digestion. *Biosci Biotech Biochem* 60: 1705-1708.
- Fernando, D., Nakkeeran, and Z. Yilan. 2005. Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and Its Relation in Biocontrol of Plant Diseases dalam: Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. *Springer*. 67-109.
- Hadioetomo, R. S. 1985. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Gramedia, Jakarta.
- Huang CJ, Wang TK, Chung SC, Chen CY. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28.9. *J Biochem Mol Biol* 38: 82-88
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *J. Clin Microbiol* ; 45(9): 2761-2764.
- Lim HS, Kim YS, Kim SD. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and

- Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl Environ Microbiol* 57: 510-516.
- Lee, Y. K., Jung, H.J., and Lee, H.K. 2006. Marine Bacteria Associated with the Korean Brown Alga, *Undaria pinnatifida*. *The Journal of Microbiology*. Vol:44, No.6; 694-698.
- Long Richard A., Azam F. 2001. Microscale Patchiness of Bacterioplankton Assemblage Richness in Seawater. *Journal Aquatic microbial Ecology*. Vol. 26: 103-113.
- Madigan MT, Martinko JK, Parker JW. 2000. Brock Biology of Microorganism. New Jersey. Prentice Hall Inc
- Mayrowani H. 2012. Pengembangan pertanian organik di Indonesia. *For. Penelitian Agro Eko*. 30 (2): 91-108.
- Rai, M. K. 2006. Handbook of Microbial Biofertilizer. Food Production Press. New York.
- Rostini, N. 2011. 6Jurus Bertanam Cabai Bebas Hama dan Penyakit. AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- Susilowati, A. 2011. Karakterisasi Fisiologi dan Genetik *Pseudomonas* sp. sebagai Biokontrol Penyakit Cendawan Tular Tanah pada Tanaman Kedelai. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Journal Biology Techniques* 10:506-513.
- Widodo. 2000. Studies on the Biological Control of *Fusarium* Basal Rot of Onion Caused by *fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. *Disertation*. Japan: Hokkaido University Sapporo, Graduated School of Agricultural, 186 p.
- Winarsih, S. 2007. Pengaruh Bahan organik pada pertumbuhan *Gliocladium virens* dan daya antagonisnya terhadap *Fusarium oxysporum* secara In-Vitro. *Jurnal Ilmu-ilmu pertanian Indonesia* 3:386-390.
- Woese CR. 2006. How we do, dont and should look at bacteria and bacteriologi. In Prokaryotes (3th) Volume 1. Martin Dworkin (editor-in-chief). Science and Business Media Inc. Singapore, Springer, pp. 1-23.
- Yuwono T. 2006. *Biologi Molekuler*. Erlangga .Jakarta