

## POTENSI RIZOBAKTERI PEMBENTUK ENDOSPORA DARI TANAMAN PADI SEBAGAI BIOKONTROL FITOPATOGEN *Xanthomonas oryzae*

Maerani Sumarno<sup>1)</sup>, Anto Budiharjo<sup>2)</sup>, Sri Pujiyanto<sup>3)</sup>

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang 50275

Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690

email: [sumarno.maerani@gmail.com](mailto:sumarno.maerani@gmail.com)

### ABSTRACT

*Xanthomonas oryzae* is phytopathogen causing bacterial leaf blight which decreases in agricultural product reaching 20-70 % in Asia. Bacterial leaf blight symptoms is characterized by the formation of lines in the leaf blade turnings yellow, then white, causing the plant to wither and die. Endospore-forming rhizobacteria are soil microbes potential as biocontrol to inhibit phytopathogen growth. The aims of this study were to isolate endospore-forming rhizobacteria from rice plant and determine its ability as biocontrol against *X. oryzae*. The methods used consisted of isolation, antibacterial activity test, molecular identification, and biochemical characterization. Twenty isolates of endospore-forming rhizobacteria were obtained from the isolation of the rice crop. Isolate P-10 had the greatest ability against *X. oryzae* with inhibition zone of 18.89 mm. Molecular identification using 16S rRNA gene showed that isolates P-10 had 98 % homology with *Bacillus pumilus*. Biochemical characterization showed the isolate P-10 had a rod-shaped with center of endospores, gram-positive, catalase positive, are motile, negative in starch hydrolyze, not forming gas on glucose, these characteristics fitted with *B. pumilus* character.

*Keywords* : Rice plant, antibacterial, *Xanthomonas oryzae*, endospore-forming, rhizobacteria

### ABSTRAK

*Xanthomonas oryzae* adalah fitopatogen penyebab hawar daun bakteri yang mengakibatkan penurunan hasil pertanian rata-rata mencapai 20-70 % di wilayah Asia. Gejala hawar daun bakteri ditandai dengan terbentuknya garis pada helaian daun yang berubah menjadi kuning, kemudian putih hingga menyebabkan tanaman menjadi layu dan mati. Rizobakteri pembentuk endospora merupakan mikroba tanah yang berpotensi sebagai biokontrol dalam menghambat pertumbuhan fitopatogen. Tujuan penelitian ini adalah diperolehnya isolat rizobakteri pembentuk endospora dari tanaman padi sebagai biokontrol terhadap fitopatogen *X. oryzae*. Metode yang digunakan meliputi, isolasi, uji aktivitas antibakteri, identifikasi secara molekuler, dan karakterisasi secara biokimia. Rizobakteri pembentuk endospora yang diperoleh dari hasil isolasi tanaman padi sebanyak dua puluh isolat. Isolat P-10 merupakan isolat yang mempunyai daya hambat terbesar terhadap *X. oryzae* dengan zona hambat sebesar 18,89 mm. Hasil identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA menunjukkan isolat P-10 memiliki homologi 98% dengan *Bacillus pumilus*. Karakterisasi biokimia menunjukkan isolat P-10 berbentuk batang dengan letak endospora di tengah, gram positif, positif menghasilkan katalase, bersifat motil, negatif dalam menghidrolisis pati, tidak membentuk gas pada glukosa, karakteristik tersebut sesuai dengan karakter *B. pumilus*.

*Kata kunci*: Tanaman padi, antibakteri, *Xanthomonas oryzae*, pembentuk endospora, rizobakteri

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara berkembang yang tiap tahun jumlah penduduknya meningkat secara eksponensial. Menurut Badan Pusat Statistik (2013), jumlah penduduk Indonesia dari tahun 2000 sampai dengan tahun 2010 mengalami peningkatan

dari 206.264.595 menjadi 237.641.326 jiwa. Peningkatan jumlah penduduk Indonesia yang pesat menyebabkan Indonesia terus berupaya melakukan berbagai pengembangan dalam bidang pertanian guna meningkatkan produktivitasnya.

Permasalahan yang seringkali menjadi kendala utama dalam pertanian adalah serangan

patogen yang mengakibatkan hasil pertanian menurun drastis. Salah satu penyakit utama pada tanaman padi di Indonesia serta negara Asia lainnya yaitu hawar daun bakteri (*bacterial leaf blight*) atau dikenal pula dengan istilah “kresek” yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae*. Kehilangan hasil yang diakibatkan oleh penyakit tersebut di Indonesia mencapai 70-80 %, di India mencapai 74-81 %, dan Jepang mencapai 20-50 % sehingga menyebabkan kerugian besar secara ekonomi bagi petani (Djarmiko et al., 2011). Infeksi yang disebabkan oleh *X. oryzae* menimbulkan gejala yang khas yakni, serangannya pada tanaman yang masih muda menyebabkan daun berubah menjadi kuning pucat, putih, layu, dan akhirnya mati (Wahyudi et al., 2011).

Penggunaan pestisida kimia merupakan upaya yang selama ini dilakukan guna mengatasi gangguan penyakit pada tanaman karena dinilai efektif dan cepat. Namun, di sisi lain diketahui pula penggunaan pestisida kimia berdampak buruk, baik bagi keamanan konsumen dan lingkungan. Hal tersebut disebabkan karena aplikasi penggunaan pestisida kimia meninggalkan residu yang membahayakan kesehatan konsumen dan menyebabkan matinya predator alami yang berdampak buruk terhadap keseimbangan ekosistem (Wahyudi et al., 2011). Oleh karena timbulnya efek merugikan akibat penggunaan pestisida kimia, diperlukan alternatif lain yang dapat menanggulangi gangguan penyakit pada tanaman yang bersifat ramah lingkungan, yakni dengan penggunaan agen hayati sebagai biokontrol.

Rizobakteri merupakan agen hayati yang dapat menekan keberadaan patogen tanaman. Keberadaan rizobakteri dapat mengurangi populasi patogen tumbuhan melalui kompetisi serta produksi senyawa antibakteri. Menurut Mahartha et al. (2013), rizobakteri diketahui pula mampu memicu ketahanan sistemik terinduksi pada tanaman sehingga memberikan perlindungan terhadap tanaman dari serangan fitopatogen.

Salah satu agen biokontrol yang sukses digunakan melawan patogen adalah rizobakteri pembentuk endospora. Ryu (2005), menyatakan bahwa keuntungan utama menggunakan rizobakteri pembentuk endospora adalah bentuk endospora yang lebih stabil dan tahan di bawah kondisi tidak menguntungkan. Bentuk endospora membuat rizobakteri tersebut mudah diformulasikan dan dikomersialkan dengan siklus hidup yang panjang. Stabilitas dan daya tahan rizobakteri pembentuk endospora di bawah kondisi lingkungan yang beragam menyebabkan

rizobakteri ini mampu menginduksi resistensi sistemik pada sistem pertanian yang berbeda. Hasil penelitian Agustiansyah (2011) membuktikan bahwa pemberian *Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis* mampu mengurangi jumlah koloni *X. oryzae* pada biji padi. Potensi besar yang dimiliki rizobakteri pembentuk endosporamendorong perlunya dikembangkan penelitian mengenai pemanfaatannya sebagai biokontrol. Pemanfaatan rizobakteri pembentuk endospora sebagai biokontrol merupakan salah satu upaya peningkatan produktivitas pertanian Indonesia yang ramah lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah diperolehnya isolat rizobakteri pembentuk endospore dari tanaman padi sebagai biokontrol terhadap fitopatogen *X. oryzae*.

## METODOLOGI

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi dan Genetika molekuler Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2014.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung, inkubator, autoklaf, *Laminar air flow*, jarum ose, penangas air, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, *rotary shaker*, *vortex*, *blue tip*, *yellow tip*, jangka sorong, bunsen, mikro pipet, mikroskop, eppendorf, *Polymerase Chain Reaction (PCR)* (Bio-Rad), gel elektroforesis (Thermo Scientific), *gel documentation* (Uvitech), *nanodrop 2000*, *cool box*, *cutter*, corong, timbangan, batang pangaduk, rak pengecatan, *spreader*, timbangan analitik, *centrifuge*, *freezer*, *micro centrifuge* (Lab Gene Scanspeed 1730r), spektrofotometer (Optima SP 300), *timer*, *tube*.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu sampel tanah rizosfer tanaman padi, akuades, *tryptic soy agar (TSA)*, *tryptic soy broth (TSB)*, *paper disc 8 mm* (Advantec), isolat *Xanthomonas oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman Universitas Brawijaya), *crystal violet*, *acetone*, *soluble starch*, 3 %  $H_2O_2$ , *phosphate buffered saline*, kaca objek, gelas penutup, minyak imersi, lugol iodin, *loading dye*, primer1429R, primer27F, agarosa 1%, alkohol, kapas, kasa, spirtus, tisu, aluminium foil, *Bacillus subtilis*, glukosa, *beef extract*, *bacto-agar*, safranin, saponin 0,5 %,

triptikase, chelex 20 %, buffer TAE 1x, KAPA 2G fast kits, low mass ladder marker.

## Cara Kerja

### a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan untuk memperoleh sampel tanah rizosfer tanaman padi di persawahan organik Kecamatan Banyubiru Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Tanah rizosfer berasal dari dua rumpun tanaman padi dan dimasukkan ke dalam plastik steril. Tanah dalam plastik dimasukkan ke dalam *ice box* guna menjaga kesegaran tanah selama perjalanan. Tanah rizosfer diukur iklimnya, meliputi pengukuran pH, kelembaban, suhu, dan ketinggian.

### b. Isolasi Rizobakteri Pembentuk Endospora

Isolasi rizobakteri bertujuan untuk memperoleh rizobakteri pembentuk endospora dari tanaman padi. Metode isolasi yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan Ryu (2005) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 5 gram tanah yang melekat pada rizosfer tanaman padi dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer berisi 45 mL akuades steril. Suspensi tanah dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit dalam penangas air, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10<sup>-6</sup>. Sebanyak 1 mL dari pengenceran suspensi tanah dituang pada medium TSA, masing-masing perlakuan dilakukan secara duplo. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 24-48 jam, lalu 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 Aktivitas Antibakteri Rizobakteri terhadap *Xanthomonas oryzae*

Uji aktivitas antibakteri terhadap *X. oryzae* secara *in vitro* dilakukan untuk menyeleksi rizobakteri pembentuk endospora yang berpotensi sebagai biokontrol terhadap *X. oryzae*. Isolat *X. oryzae* yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman Universitas Brawijaya. Isolat rizobakteri pembentuk endospora *X. oryzae* ditumbuhkan pada 5 mL medium TSB selama *overnight* pada suhu 30°C dalam *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Kultur cair *X. oryzae* sebanyak 5 mL dicampurkan pada 250 mL TSA kemudian dituang dalam petri dan dinginkan hingga memadat. Sebanyak 20 µL kultur rizobakteri pembentuk endospora diteteskan pada

*paper disc* 8 mm dalam medium yang sama dengan bakteri uji. Petri yang berisi kultur *X. oryzae* dan rizobakteri pembentuk endospora diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan secara duplo dan pengukuran zona hambat dilakukan setiap 24 jam. Kontrol negatif dilakukan dengan memberikan 20 µL akuades steril.

### d. Identifikasi Isolat Uji secara Molekuler

#### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Chelex (Walsh *et al.*, 2013). Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan 3 ose kultur bakteri umur 24 jam ke dalam *tube* yang telah diberi 100 µL ddH<sub>2</sub>O dan ditambahkan 1 mL saponin 0,5%, perendaman kultur bakteri dalam saponin 0,5% dilakukan selama *overnight* pada suhu 4°C. Campuran kultur bakteri dan saponin 0,5% di *centrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm dan kemudian supernatant dibuang. Supernatant merupakan DNA yang siap digunakan untuk proses PCR.

#### Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR berdasarkan metode yang dilakukan oleh Radjasa *et al.* (2001). Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan perlakuan suhu sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit, dan ekstensi 72°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan ekstensi akhir 72°C selama 7 menit dan suhu penyimpanan pada tahap akhir 4°C.

Primer yang digunakan untuk proses PCR gen 16S rRNA adalah primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Osborne *et al.*, 2005). Bahan-bahan yang digunakan dalam proses PCR ini yaitu 1,5 µL primer 27F; 1,5 µL primer 1492R; 3 µL DNA *template*; 25 µL KAPA 2GFAST kits dan 19 µL ddH<sub>2</sub>O.

Visualisasi produk PCR 16S rRNA dilakukan menggunakan analisis elektroforesis dengan cara memasukkan 5 µL produk PCR dan *marker* (1 µL *loading dye* dan 1 µL DNA *low mass ladder marker*) ke dalam sumuran gel agarosa 1 % (dalam 100 mL mengandung 5,33 µL EtBr) yang telah direndam larutan buffer TAE 1x, gel kemudian dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 V selama 30 menit.

Terakhir, pita hasil produk PCR dilihat menggunakan *gel documentation*.

#### Analisis sekuens

Produk PCR selanjutnya disekuens untuk mengetahui jumlah dan urutan basanya di PT. Genetika Science Indonesia. Sekuens yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan penyejajaran yang terdapat dalam fasilitas penyejajaran *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di *gen bank*.

#### Pembuatan Pohon Filogenetik

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA 5.0. Sekuens isolat yang akan dianalisis dibandingkan dengan sekuens bakteri yang memiliki persentase homologi tertinggi serta dibandingkan pula dengan sekuens jenis bakteri lainnya. Pohon filogenetik dikonstruksi dengan *Test Neighbor-joining tree* dan diuji dengan *Bootstrap method*.

#### e. Karakterisasi secara Biokimia

Karakterisasi secara biokimia dilakukan dengan mengikuti beberapa kriteria berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* yaitu dengan melakukan uji produksi gas dari glukosa, hidrolisis pati, pewarnaan endospora dan uji katalase.

#### Uji Katalase

Koloni rizobakteri 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 menunjukkan reaksi yang negatif (Brown, 2012).

#### Uji Hidrolisis Pati

Satu ose isolat bakteri ditanam dengan metode goresan pada medium agar pati. Kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 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 (Brown, 2012).

#### Uji Produksi Gas dari Glukosa

Satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium glukosa cair fenol merah (dengan tabung durham). Kultur diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar. Gelembung yang terdapat dalam tabung durham menunjukkan bahwa fermentasi juga menghasilkan gas karbondioksida (CO<sup>2</sup>) (Brown, 2012).

#### Pewarnaan Endospora

Satu ose isolat bakteri berumur ± 10 hari diletakkan di atas gelas benda kemudian dilakukan fiksasi. Isolat bakteri pada gelas benda selanjutnya diteteskan *crystal violet* sebanyak 2-3 tetes, diamkan selama 1 menit dan bilas dengan air mengalir. Pengamatan endospora dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (Hiss, 1905).

#### f. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menanamkan biakan bakteri pada media TSB semisolid dengan cara tusuk (*stab inoculation*) sedalam 5 cm, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Hasil positif (motil) ditunjukkan jika bakteri tumbuh pada seluruh permukaan media yang semisolid, hasil negatif ditunjukkan jika bakteri hanya tumbuh pada daerah tusukan saja (Brown, 2012).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses isolasi diawali dengan pengukuran mikroklimat tanah rizosfer tanaman padi. Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran mikroklimat rizosfer tanaman padi.

Tabel 1. Pengukuran mikroklimat tanah rizosfer tanaman padi

Pengukuran	Nilai
Kelembaban	53 %
Suhu	25°C
Ph	5
Ketinggian	600 m dpl

Slepecky dan Hemphill (2006), menyatakan bahwa untuk memperoleh bakteri pembentuk endospora yang berasal dari berbagai habitat seperti tanah, air, makanan dan lainnya dapat diisolasi dengan mensuspensikan sampel dalam air dan memanaskannya pada suhu 80°C selama 10-30 menit. Spora tahan terhadap pemanasan walaupun pada suhu yang tinggi,

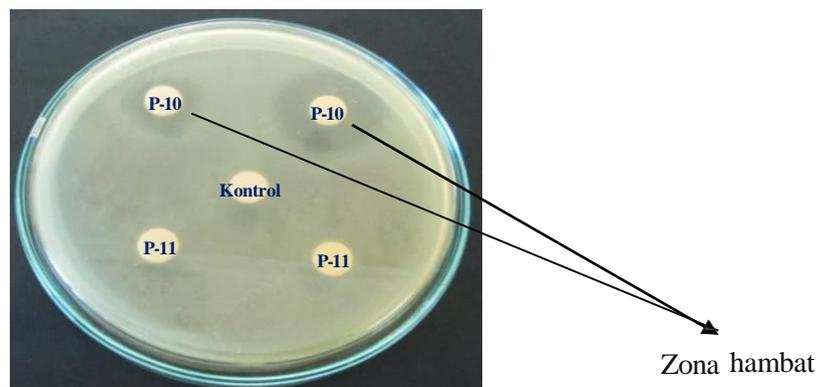
sehingga dengan perlakuan tersebut memungkinkan hanya isolat rizobakteri pembentuk endospora yang diperoleh. Bakteri non-pembentuk endospora bentuk vegetatif pembawa spora secara umum mati oleh pemanasan pada suhu 60-70°C, sedangkan spora bakteri dapat bertahan sampai suhu 100°C atau lebih (Salle, 1993). Berdasarkan hasil isolasi yang telah dilakukan, diperoleh 20 isolat rizobakteri pembentuk endospora dengan

karakter morfologi koloni dan sel seperti pada Tabel 2.

Seleksi terhadap isolat rizobakteri pembentuk endospora yang berpotensi sebagai biokontrol dilakukan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap fitopatogen *X. oryzae*, menunjukkan bahwa hanya isolat rizobakteri pembentuk endospora P-10 mampu menghambat pertumbuhan *X. oryzae*, seperti yang diperlihatkan pada Gambar 1.

Tabel 2. Morfologi koloni dan sel rizobakteri pembentuk endospora dari tanaman padi

Isolat	Karakteristik				
	Warna	Bentuk Koloni	Elevasi	Bentuk Sel	Gram
P-1	Putih susu	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-2	Putih susu	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	Basil	Positif
P-3	Kuning gading	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	Basil	Positif
P-4	Putih keruh	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-5	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Umbonate</i>	Basil	Positif
P-6	Putih pucat	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-7	Putih susu bening	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-8	Putih pucat	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-9	Putih bening	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-10	Putih	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-11	Putih	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	Basil	Positif
P-12	Putih	<i>Circular</i>	<i>Umbonate</i>	Basil	Positif
P-13	Kuning gading	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	Basil	Positif
P-14	Putih	<i>Rhizoid</i>	<i>Flat</i>	Basil	Positif
P-15	Putih	Bertekuk	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-16	Putih-kekrem	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	Basil	Positif
P-17	Krem muda	<i>Circular</i>	<i>Umbonate</i>	Basil	Positif
P-18	Putih-krem muda	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	Basil	Positif
P-19	Kuning-orange	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	Basil	Positif
P-20	Putih bening	<i>Circular</i>	<i>Umbonate</i>	Basil	Positif



Gambar 1. Uji aktivitas antibakteri isolat P-10 terhadap *X. oryzae* inkubasi 48 jam pada suhu 30°C

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri, isolat P-10 mampu menghambat pertumbuhan fitopatogen *X. oryzae* dengan ditunjukkan adanya zona bening pada daerah sekeliling *paper disc*. Berdasarkan hasil pengukuran, isolat P-10 mampu menghasilkan diameter daya hambat sebesar 18,89 mm pada masa inkubasi 48 jam. Kontrol negatif dilakukan dengan memberikan akuades steril pada *paper disc*.

Davis & Stout (1971) dalam Fitri & Bustam (2010), menjelaskan kriteria kekuatan daya antibakteri terbagi menjadi beberapa kategori, antara lain: diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, dan diameter zona hambat lebih dari 20 mm dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kriteria tersebut, daya hambat isolat P-10 yang sebesar 18,89 mm tergolong dalam kategori kuat.

Zona bening tersebut diduga muncul karena senyawa antibakteri telah berdifusi dari *paper disc* ke sekitar media dan juga sebagai suatu respon sensitivitas *X. oryzae* terhadap senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat P-10. Mekanisme perlawanan isolat P-10 terhadap *X. oryzae* secara *in vitro* diduga merupakan mekanisme antibiosis sebagai upaya penekanan pertumbuhan *X. oryzae*. Pernyataan ini diperkuat oleh Allabouvette et al. (2006) bahwa antibiosis merupakan suatu mekanisme yang digunakan biokontrol seperti *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. karena kemampuannya dalam memproduksi antibiotik, bakteriosin, enzim pendegradasi dinding sel, dan senyawa volatil lainnya.

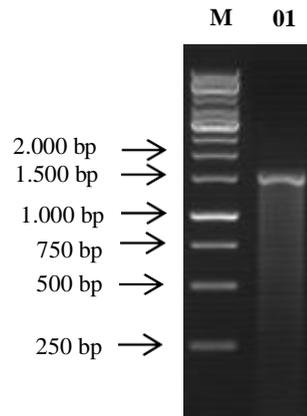
Hassi et al. (2012), menerangkan bahwa *Bacillus* memiliki beberapa antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif ataupun jenis antibiotik yang mampu membunuh bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Slepecky & Hemphill (2006), mengemukakan bahwa beberapa jenis antibiotik yang dihasilkan oleh beberapa anggota *Bacillus* yaitu, subtilin, surfaktin, bacilisin dari *Bacillus subtilis*; pumilin, tetain, amikacin, micrococcin dari *B. pumilus*; polimixin, colistin

dari *B. polymyxa*, bacitrasin, protisin dari *B. licheniformis*.

Hasil ekstraksi DNA dengan menggunakan metode chelex sebagai tahap awal identifikasi molekuler diperoleh hasil konsentrasi DNA isolat P-10 yakni 134 ng/ $\mu$ L dengan kemurnian 1,72 pada rasio 260/280. Musapa et al. (2013), menambahkan bahwa keuntungan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode chelex adalah sederhana, reagen yang digunakan lebih sedikit dibandingkan metode standar lainnya. Nilai kemurnian DNA 1,72 mengindikasikan DNA terkontaminasi protein. Sambrook et al. (1989), mengemukakan bahwa nilai kemurnian DNA yang terbebas dari pengotor RNA dan protein berkisar antara 1,8-2,0. Menurut Mulyani et al. (2010), selain beberapa keunggulan penggunaan metode *thermal lysis* dalam ekstraksi DNA, nilai kemurnian DNA rendah yang dihasilkan dikarenakan metode ini memotong proses isolasi dengan tidak melibatkan tahap pemurnian dan pencucian DNA pada proses isolasinya.

Amplifikasi DNA dilakukan pada daerah gen 16S rRNA karena menurut Janda & Sharon (2007), gen 16S rRNA pada hampir terdapat pada seluruh bakteri, fungsi gen 16S rRNA pada waktu yang lama tidak berubah, dan gen 16S rRNA cukup panjang untuk tujuan informatika (1.500 bp). Menurut Osborne et al. (2005), primer 27F dan 1492R yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA memungkinkan amplifikasi yang hampir sempurna pada gen 16S rRNA dari kebanyakan bakteri yang telah diketahui dan telah digunakan pula untuk mempelajari bakteri pada berbagai habitat. Gambar 2 merupakan visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat P-10 pada konsentrasi gel agarosa 1% dengan menggunakan *low mass ladder marker*.

Produk PCR selanjutnya dilakukan sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida isolat P-10. Priest & Austin (1993), mengemukakan bahwa sekuensing DNA dilakukan karena klasifikasi sistematik mikroba berdasarkan informasi dalam kromosom yang dikodekan dalam sekuens nukleotida. Berdasarkan hasil sekuensing, diketahui isolat P-10 memiliki urutan basa sebanyak 1.112 bp seperti yang tertera pada Gambar 3.



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat P-10 pada konsentrasi gel agarosa 1% dengan menggunakan *low mass ladder marker* (M=marker; 01=P-10)

```

GGCGGGTGCATAATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GAGCTAATACCGGATAGTTCCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCT
GTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
TGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGC
TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCCGGGACAGAGTGACAGGGGGTGCA
TGGTTGTCCGCCACCTCCTGTCTGGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACCCACCGCCA
CCCCTTGACCTTAGTTGCCACGATTCCATTT

```

Gambar 3. Urutan basa nitrogen gen 16S rRNA hasil amplifikasi menggunakan primer 27F (A: adenin; G: guanin; T: timin; C: Cytosin)

Urutan basa isolat P-10 dianalisis untuk mengetahui homologinya dengan spesies yang memiliki kemiripan sekuens dengan isolat P-10 menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil analisis sekuensing DNA isolat P-10 dengan menggunakan BLAST diperoleh hasil bahwa isolat ini memiliki homologi sebesar 98 % dengan *Bacillus pumilus*. Urutan basa *B. pumilus* NBRC 12092

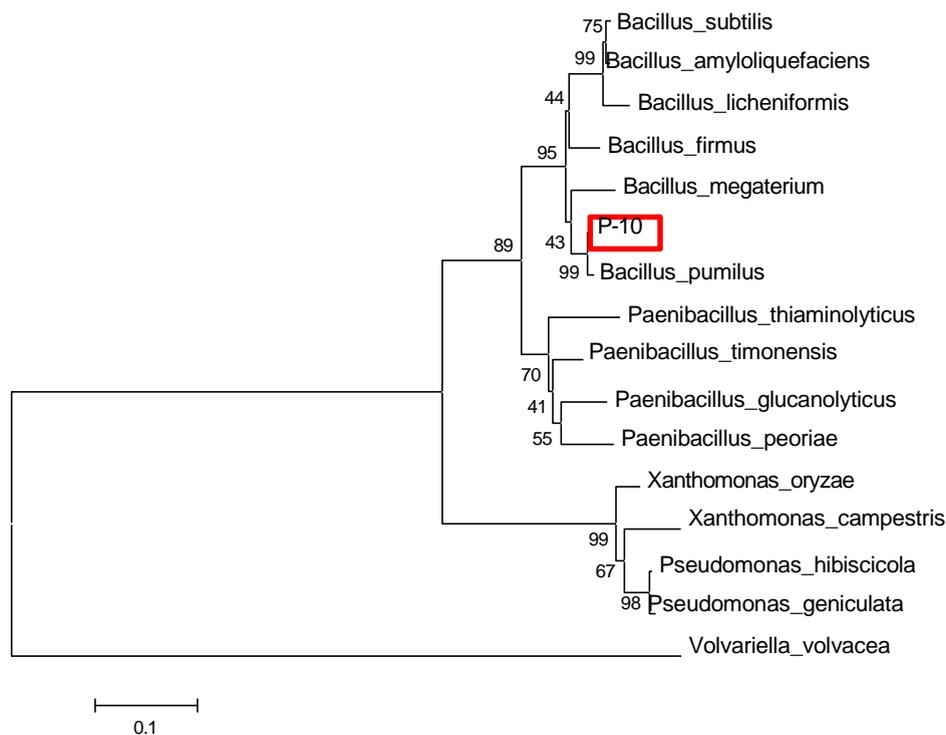
yang memiliki persentase (98 %) dan nilai kemiripan tertinggi dengan urutan basa isolat P-10 dengan gaps 0 %.

Pohon filogenetik dibuat untuk mengetahui hubungan kekerabatan isolat P-10 dengan *B. pumilus* dan bakteri lainnya sebagai pembandingan. Sekuens bakteri pembandingan diperoleh dari database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Pembuatan

pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software* Mega 5.0 dan dikonstruksi dengan cara *test neighbor-joining tree* serta diuji menggunakan metode *bootstrap*. Gambar 4 merupakan pohon filogenetik dengan menggunakan metode *neighbor-joining*.

Pohon filogenetik dibuat dengan membandingkan sekuens isolat P-10 dan sekuens yang memiliki nilai kemiripan tertinggi dengan sekuens P-10 yakni *B. pumilus* serta beberapa genus lainnya yang juga merupakan kelompok rizobakteri seperti *Paenibacillus* serta dengan spesies *Bacillus* lainnya yang juga

mampu menghasilkan senyawa antibakteri. Berdasarkan pohon filogenetik yang tampak pada Gambar 4, antara isolat P-10 dengan *B. pumilus* menunjukkan nilai *bootstrap* 99. Kemiripan antara isolat P-10 dengan beberapa spesies *Bacillus*, diduga dikarenakan adanya beberapa sifat yang sama, salah satunya yaitu kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antibakteri. Foldes et al. (2000), menjelaskan pula beberapa anggota genus *Bacillus* memproduksi senyawa antibakteri beragam, contohnya antibiotik.



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasarkan perbandingan gen 16S rRNA menggunakan *Neighbor-joining* dengan uji *bootstrap* 500 dan *Volvariella volvacea* sebagai *outgroup*

Karakterisasi isolat secara mikrobiologi dan biokimia dapat dilakukan sebagai konfirmasi dari identifikasi isolat secara molekuler. Karakterisasi secara biokimia terhadap isolat P-10 dilakukan dengan menggunakan beberapa kriteria sifat *B. pumilus* berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Breed et al., 1957). Tabel 3 merupakan karakteristik biokimia *B. pumilus* dan isolat P-10.

*Bacillus* memiliki karakteristik diantaranya yaitu, berbentuk batang, pembentuk spora, kebanyakan motil dan dibedakan

berdasarkan metabolismanya. *B. pumilus* memiliki karakteristik yaitu katalase positif, tidak menghasilkan gas pada glukosa, hidrolisis pati negatif (Slepecky & Hemphill, 2006). *B. pumilus* memiliki endospora yang terletak *central* (Doi, 1992; Hatmanti, 2000).

Hasil pewarnaan gram seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5 menunjukkan bahwa isolat P-10 adalah bakteri gram positif dan berbentuk batang (basil) dengan letak endospora di tengah. Hasil uji katalase pada isolat P-10 menunjukkan adanya gas yang terbentuk setelah kultur bakteri ditetaskan 3 %

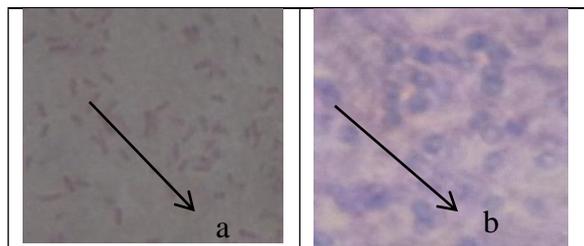
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang membuktikan bahwa isolat ini memiliki enzim katalase yang mampu mengubah peroksida menjadi gas dan air.

Tabel 3. Karakteristik biokimia *B. pumilus* dan isolat P-10

Karakteristik	<i>B. pumilus</i>	P-10
Pewarnaan Gram	+	+
Bentuk Sel	Batang	Batang
Letak Endospora	<i>Central</i>	<i>Central</i>
Katalase	+	+
Motilitas	+	+
Hidrolisis pati	-	-
Produksi Gas dari Glukosa	-	-

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

Tumbuhnya isolat P-10 pada daerah tusukan medium semisolid menunjukkan bahwa isolat P-10 bersifat motil yang ditunjukkan dengan pergerakannya di sekitar daerah tusukan. Brown (2012), menjelaskan bahwa kebanyakan *Bacillus* sp. bersifat motil dengan adanya flagella. Isolat P-10 tidak pula menghasilkan enzim amilase sehingga tidak dapat menguraikan molekul pati. Isolat P-10 tidak pula menghasilkan gas dalam medium glukosa.



Gambar 5. a. Sel vegetatif isolat P-10  
b. Endospora isolat P-10

## SIMPULAN

Hasil isolasi tanah rizosfer dari tanaman padi diperoleh dua puluh isolat rizobakteri pembentuk endospora. Isolat P-10 merupakan isolat yang mempunyai kemampuan terbesar dalam menghambat pertumbuhan fitopatogen *X. oryzae* dengan zona hambat sebesar 18,89 mm. Hasil

identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat P-10 merupakan *Bacillus pumilus*. Isolat P-10 memiliki karakteristik morfologi dan biokimia yang sama pula dengan *B. pumilus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustiansyah. 2011. Perlakuan benih untuk perbaikan pertumbuhan tanaman, hasil, dan mutu benih padi serta pengendalian penyakit hawar daun bakteri dan pengurangan penggunaan pupuk fosfat. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Allabouvette, C., C. Olivain, dan C. Steinberg. 2006. Biological control of plant diseases: the *Eurepoan* situation. *Europ. J. Pla. Pathol.* 114: 329-341.
- BPS. 2013. Laporan bulanan data sosial ekonomi. *Sensus pertanian* edisi 40: 1-116.
- Breed, R. S., E.G.D.Muray, dan N.R.Smith. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company, USA.
- Brown, A. E. 2012. *Benson's Microbiology Applications: Laboratory Manual in General Microbiology*. McGraw-Hill Inc., New York.
- 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.
- Fitri, L., dan B. M. Bustam. 2010. Screening of antimicrobial producing strains isolated from the soil of grassland rhizosphere in Pocut Meurah Intan Forest Park, Seulawah, Aceh besar. *Biodiver.* 11 (3): 129-132.
- Foldes, T., I. B., Z. Herpai, L. Varga, dan J. Szigeti. 2000. Isolation of *Bacillus* strain from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *J. App. Microbiol.* 89: 840-846.
- Hassi, M., S. David, A. Haggoud, S. E. Guendouzi, A. E. Ouarti, S. I. Souda, dan M. Iraqui. 2012. In vitro and intracellular antimycobacterial activity of a *Bacillus pumilus* strain. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6 (10): 2299-2304.

- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseano*. 25 (1): 31-41.
- Hiss, P. J. 1905. Contribution of physiological differentiation of *Pneumococcus* and *Streptococcus* and to methos of staining capsule. *J. Exptl. Med.* 6: 317-345.
- Janda, J. M., dan S .L. Abbott. 2007. 16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45 (39): 2761-2764.
- Mahartha, K. A., K. Khalimi, dan G. N. Alit. 2013. Uji efektivitas rhizobakteri sebagai agen antagonis terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. capsici penyebab penyakit layu *Fusarium* pada tanaman cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.). *E-Jur. Agroekotek. Trop.* 2 (3): 145-154.
- Mulyani, Y., A. Purwanto, dan I. Nurruhwati. 2010. Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini KOI Herpes Virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Artikel. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjajaran. Bandung.*
- Musapa, M., T .Kumwenda, M. Mkulama, S. Chishimba, D. E. Noris, P. E. Thuma, dan S. Mharakurwa. 2013. A simple chelex protocol for DNA extraction from *Anopheles* spp. *J. Vis. Exp.* 71: 1-7.
- Osborne, C. A., M. Galic, P. Sangwan, dan P. H. Jansen. 2005. PCR generated artifact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 183-187.
- Priest, F., dan B. Austin. 1993. *Modern Bacterial Taxonomy*. Chapman and Hall, London.
- Radjasa, O.K., Urakawa, K. Kita-Tsukamoto, dan Ohwada. 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.
- Ryu, Choong-Min., J. Kim, O. Choi, Soo-Young Park, Seung-Hwan Park, dan Chong-Seuk Park. 2005. Nature of root-associated *Paenibacillus polymyxa* from field-grown winter barley in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol* 15 (5): 984-991.
- Salle, A. J. 1993. *Fundamental Principles of Bacteriology*. McGraw-HillInc., New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press, Texas.
- Slepecky, R. A., dan E. Hemphill. 2006. The genus *Bacillus*-nonmedical. *Prokar.* 4: 530-562.
- Suryana, A. dan Hermanto. 2004. *Kebijakan Ekonomi Perbesaran Nasional. Badan Litbang Pertanian. Jakarta.*
- 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.
- Walsh, P. S., Metzger, dan Higuchi. 2013. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 54 (3): 134-139.

