

**EKSPLORASI *Bacillus* spp. PADA BEBERAPA RHIZOSFER GULMA
DAN POTENSINYA SEBAGAI AGENS PENGENDALI HAYATI
PATOGEN TANAMAN SECARA *IN VITRO***

*Eksploration of Bacillus spp. In Several Weeds Rhizosphere and Their Potential
as Biological Control Agent of Plant Pathogen by In vitro*

Rana Virga Tesha Syofiana¹ dan Rachmi Masnilah¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jl. Kalimantan 37

Jember. 68121

ranavirga@yahoo.com

ABSTRAK

Salah satu kelompok rhizobacteria yang telah banyak diteliti sebagai agens pengendali hayati adalah *Bacillus* spp. Melalui mekanisme induksi ketahanan dan antibiosis, bakteri ini mampu menekan pertumbuhan patogen tanaman. Kemampuannya yang cepat dalam mengkolonisasi akar tanaman dan adaptasi yang luas terhadap lingkungan menyebabkan *Bacillus* tersebar di alam, terutama pada daerah rhizosfer. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan *Bacillus* pada beberapa rhizosfer gulma serta kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan patogen tanaman secara *in vitro*. Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu, (1) kegiatan pengambilan sampel yang dilakukan di daerah Kalisat, Kabupaten Jember, dan (2) kegiatan isolasi, seleksi, serta identifikasi. Berdasarkan hasil penelitian, sebanyak 17 isolat *Bacillus* spp. yang berhasil diisolasi dari beberapa rhizosfer gulma. Hasil uji daya hambat *Bacillus* spp. secara *in vitro* diperoleh daya hambat sebesar 73% dalam menekan *Fusarium* sp. dan 14 mm zona bening yang terbentuk oleh *Bacillus* terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae*. Sebanyak 5 isolat unggul *Bacillus* yang diperoleh dari uji antagonis diidentifikasi sebagai *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, dan *B. coagulans*.

Kata Kunci: agen hayati, *Bacillus* spp., rhizosfer gulma

ABSTRACT

One group of rhizobacteria that has been widely studied as a biological controlling agent is Bacillus spp. Through the mechanism of induction of resistance and antibiosis, these bacteria are able to suppress the growth of plant pathogens. Its ability to quickly colonize plant roots and broad adaptability to the environment causes Bacillus to spread in nature, especially in the rhizosphere. This study aims to determine the presence of Bacillus in several rhizosphere weeds and their ability to inhibit plant pathogen growth in vitro. This study consisted of two stages, namely, (1) sampling activities carried out in the Kalisat area, Jember Regency, and (2) isolation, selection and identification. Based on the results of the study, 17 Bacillus spp. Isolates. which was successfully isolated from several rhizosphere weeds. The results of Bacillus spp. in vitro the inhibition was obtained by 73% in suppressing Fusarium sp. and 14 mm clear zone formed by Bacillus against X. oryzae pv. oryzae. 5 superior Bacillus isolates obtained from the antagonist test were identified as B. subtilis, B. licheniformis, B. alvei, and B. coagulans.

Keyword: *Bacillus* spp., biological agents, weeds of rhizosphere

PENDAHULUAN

Patogen tanaman merupakan mikroorganisme yang dapat menyebabkan penyakit pada tanaman. Umumnya, patogen memperoleh nutrisi, air, dan segala sesuatu untuk memenuhi kebutuhan hidup dari inangnya. Keberadaan patogen pada suatu jaringan tanaman dapat menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman menjadi terganggu secara fisiologi. Lebih lanjut, kehadiran patogen dapat merusak kualitas maupun kuantitas tanaman sehingga dapat menurunkan nilai jual dari produk pertanian (Pscheidt, 2011). Beberapa patogen tanaman yang termasuk patogen penting dan banyak dijumpai di lahan pertanian serta menyebabkan kerugian yang cukup tinggi diantaranya adalah *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) dan *Fusarium* sp. (Hillocks and Waller, 1997).

Salah satu upaya untuk menekan perkembangan patogen adalah dengan teknik pengendalian. Pengendalian yang saat ini telah banyak dikembangkan adalah pengendalian hayati yang berorientasi terhadap penggunaan agens hayati. Pengendalian ini dirasa aman, efektif, serta tidak menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan dan organisme lain. Aplikasi agens hayati terhadap patogen tanaman diharapkan mampu mempersempit penyebaran dari patogen.

Di alam, terdapat banyak mikroba rhizosfer yang mampu menunjang pertumbuhan tanaman. Beberapa diantaranya bersifat antagonis bagi patogen tanaman. Melalui mekanisme isolasi dan seleksi terhadap mikrobial dalam tanah diharapkan mampu mendukung pertumbuhan dan ketahanan tanaman terhadap patogen. Salah satu genus bakteri yang dilaporkan melimpah jumlahnya di daerah rhizosfer adalah *Bacillus* spp.

Bacillus merupakan salah satu genus rhizobacteria yang telah banyak diteliti dan dikembangkan. Kemampuannya dalam beradaptasi terhadap lingkungan menjadikan bakteri ini banyak ditemukan di alam terutama pada daerah rhizosfer. Menurut Putra dan Giyanto (2014), *Bacillus* spp. dapat ditemukan di tanah, air, udara, dan residu tanaman yang telah membusuk. Keberadaan *Bacillus* yang berada di tanah dan aktif di permukaan tanah dikarenakan kemampuannya dalam memanfaatkan bahan organik yang stabil di samping memanfaatkan eksudat akar, juga produk dari metabolisme bersifat toksik yang berada di daerah rhizosfer (Harwood and Cutting, 1990).

W. Chun and A.K. Vidaver dalam Schaad *et al.*, (2001) melaporkan, bahwa *Bacillus* sp. adalah bakteri tahan panas yang banyak ditemukan di daerah rhizosfer dan telah banyak diketahui mampu menghambat pertumbuhan patogen tanaman. Penelitian Prihartingsih *et al.*, (2015) berhasil mengisolasi *Bacillus subtilis* B315 dari rhizosfer kentang dan kemampuannya dalam menekan patogen *Ralstonia solanacearum*. Hasil eksplorasi dari rhizosfer kelapa sawit

menemukan potensi *Bacillus* dalam menekan *G. boinense* (Puspita *et al.*, 2013). Selain itu, kelimpahan genus *Bacillus* spp. juga ditemukan pada rhizosfer kelompok gulma *Elesunie indica* (Estuningsih *et al.*, 2012), *Mimosa pudica* (Arwiyanto, 1997), Sementara pada penelitian ramen (2014), berhasil menemukan koloni bakteri yang memiliki kemiripan dengan kelompok *Bacillus* pada gulma wewehan. Penelitian Ambarwati *et al.*, (2012) terhadap hasil eksplorasi dari perakaran gulma *Cyperus rotundus* hanya sebatas ditemukannya bakteri penghasil antibiotik tanpa diketahui jenisnya lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan *Bacillus* asal rhizosfer gulma, serta kemampuannya dalam menghambat patogen tanaman.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2018 -Oktober 2018, bertempat di Kecamatan Kalisat, Kabupaten Jember untuk pengambilan sampel dan kegiatan isolasi serta identifikasi yang dilakukan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Peremajaan Isolat Patogen

Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Isolat patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang diperoleh dari koleksi Sultan Agung Bahtiar digores pada media YPGA diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam.

Cendawan *Fusarium* sp. Isolat cendawan *Fusarium* sp. yang diperoleh dari koleksi Ales Cucu Puntarti digoreskan bagian isolat *Fusarium* sp. menggunakan jarum N pada media PDA secara aseptik, diinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari.

Penentuan Lokasi dan Pengambilan Sampel Tanah. Pemilihan lokasi dilakukan di Kecamatan Kalisat, Kabupaten Jember dengan memilih tiga lahan yang berbeda yaitu, padi, jagung, dan cabai. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan metode random sampling menggunakan sendok tanah. Sampel tanah rhizosfer gulma diambil pada kedalaman 10 cm dari permukaan. Semua sampel yang diambil kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label untuk diteliti.

Isolasi dan Seleksi Bakteri Calon Agens Hayati. Sebanyak 1 gram sampel tanah rhizosfer dipanaskan dalam oven pengering pada suhu 80°C selama dua jam, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi air steril 10 ml dan divortex hingga homogen. Suspensi tersebut dipipet sebanyak 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml air steril, kemudian dilakukan pengenceran sampai 10⁻⁶. Pada seri pengenceran 10⁻⁴, 10⁻⁵, dan 10⁻⁶ diambil 0,1 ml dan ditumbuhkan pada medium NA. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada

suhu 30°C. Koloni tunggal yang tumbuh diuji sifat Gram-nya menggunakan KOH 3% dan dihitung populasinya dengan metode cawan hitung (*Total Plate Count*) (Lay, 1994). Koloni bakteri Gram positif dimurnikan pada cawan petri medium yang sama dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30°C (Wardika, 2014).

Uji Hipersensitif. Pengujian hipersensitif bertujuan untuk mengetahui potensi patogenitas bakteri terhadap tanaman. Uji ini dilakukan terhadap tanaman tembakau pada jaringan daun yang telah membuka sempurna. Metode yang dilakukan adalah dengan mengambil suspensi inokulum bakteri yang telah diremajakan selama 48 jam dengan kerapatan 1×10^{-8} cfu/ml, kemudian diinfiltrasikan pada daun tembakau. Penginkubasian selama 48 jam atau hingga muncul gejala hipersensitif. Apabila muncul gejala hipersensitif maka isolat yang diuji merupakan bakteri patogen tanaman (Simatupang, 2008).

Potensi *Bacillus* spp. Sebagai Agen Hayati Patogen Tanaman Secara *In vitro*

Uji Antagonis *Bacillus* spp. Terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Pengujian antagonis dilakukan dengan metode *dual plating*. Bakteri antagonis ditumbuhkan pada media NA dan diinkubasikan selama 48 jam. Setelah diinkubasi, petri dibalik pada bagian tutup ditetesi klorofom sebanyak 1 ml dan didiamkan selama 2 jam hingga klorofom menguap kemudian petri dibalik seperti semula. Sebanyak 0,2 ml suspensi bakteri patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang berumur 48 jam dicampurkan dengan 4 ml agar air 0,6%, dan dituang di atas biakan bakteri antagonis, kemudian diinkubasikan selama 24-48 jam pada suhu ruang dan diamati zona bening yang terbentuk.

Mekanisme penghambatan diketahui dari agar yang berada pada zona hambat diambil secara aseptik dengan scalpel steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi air pepton 1%, dihancurkan menggunakan jarum preparat. Air pepton yang berisi agar dishaker selama 24 jam pada suhu 28°C. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan air pepton menjadi keruh dan bakteri tersebut bersifat bakteriostatik dan bila air pepton tidak menjadi keruh setelah dishaker menunjukkan penghambatan bersifat bakterisidal (Aini, 2007).

Uji Antagonis *Bacillus* spp. Terhadap *Fusarium* sp. Uji antagonis *Bacillus* spp. dengan *Fusarium* sp. dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *dual culture*. Biakan murni *Bacillus* spp. umur 48 jam diambil dengan jarum ose kemudian diletakkan di keempat sisi petri. Miselia jamur *Fusarium* sp. berumur 5 hari diambil menggunakan *cork borer* ukuran $\pm 0,5$ cm dan ditumbuhkan pada media PDA di tengah-tengah petri dengan jarak agens antagonis ke patogen masing-masing 3 cm (Hidayah and Titiek, 2015).

Identifikasi *Bacillus* spp. Secara Fisiologi dan Biokimia. Identifikasi isolat *Bacillus* spp. yang memiliki kemampuan unggul pada pengujian antagonis selanjutnya dikarakterisasi secara

fisiologi dan biokimia mengacu pada karakterisasi *Bacillus* oleh W. Chun and K. Vidaver dalam Schaad et al., (2001), yaitu sebagai berikut:

Uji Katalase. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim katalase bakteri uji. Sebanyak satu ose bakteri diteteskan dengan hydrogen peroksida 3% pada *glass object* yang telah dibersihkan. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung pada *glass object*.

Uji Pati. Uji pati dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis pati. Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium pati. Setelah 48 jam inkubasi, bakteri kemudian ditetesi dengan reagen pati. Reaksi positif terjadi apabila disekitar koloni bakteri uji menjadi kuning, sebaliknya reaksi negatif terjadi apabila disekitar koloni bakteri berwarna gelap atau biru tua.

Pertumbuhan Anaerobik Pada Media NB. Bakteri yang telah berumur 48 jam diinokulasikan pada media NB kemudian ditambahkan minyak mineral steril pada media dan diinkubasikan selama 5 hari pada suhu 24°C.

Pertumbuhan Pada Media Suhu 45°C. Isolat bakteri yang berumur 48 jam ditumbuhkan pada media NB dan kemudian disimpan pada suhu 45°C selama 5 hari. Medium yang menjadi keruh menunjukkan reaksi positif.

Pertumbuhan Pada Media pH 5,7. Isolat bakteri yang berumur 48 jam ditumbuhkan pada media NB yang disesuaikan pada pH 5,7 kemudian diinkubasikan selama 5 hari. Medium yang menjadi keruh menunjukkan reaksi positif.

Pertumbuhan Pada Media yang Mengandung 7% NaCl. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan bakteri yang berumur 48 jam pada medium NB yang mengandung 7% NaCl kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 hari. Medium yang menjadi keruh menunjukkan reaksi positif. Konsentrasi dapat ditentukan dengan mengulangi pengujian dengan kisaran konsentrasi NaCl 1-6%.

Produksi Asam dan Gas Karbohidrat. Senyawa karbohidrat (*dextrose, arabinose, manitol, dan xylose*) 1% yang telah disterilkan dan diinokulasi bakteri yang berumur 48 jam. Tutup salah satu tabung dengan minyak mineral steril sampai kedalaman 1 cm. Inkubasikan selama 7-14 hari pada suhu ruang. Produksi asam dengan adanya perubahan media menjadi kuning.

Variabel Pengamatan. Variabel pengamatan yang diamati adalah:

a. Total Populasi Bakteri

Populasi bakteri dihitung menggunakan metode Lay (1994), dengan rumus sebagai

berikut:
$$\sum \text{Populasi} = \frac{x}{p \times v}$$

Keterangan :

x = jumlah koloni yang tumbuh pada cawan

p = faktor pengenceran

v = volume suspensi yang disebar pada cawan (ml) (Putra dan Giyanto, 2014).

b. Daya Hambat *Bacillus spp.* Secara In vitro

Pengamatan daya hambat *Bacillus spp.* terhadap *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* dilakukan dengan mengukur diameter yang terbentuk dari zona bening. Untuk pengamatan uji antagonis *Bacillus spp.* dengan *Fusarium sp.* dilakukan dengan mengukur jari-jari miselium cendawan patogen yang dibandingkan dengan kontrol. Adapun rumusnya sebagai berikut:

$$\text{Hambatan (\%)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan:

$R1$ = Jari-jari koloni patogen yang menjauhi koloni bakteri antagonis

$R2$ = Jari-jari koloni patogen yang mendekati koloni bakteri antagonis

c. Karakteristik *Bacillus spp.* secara Fisiologi dan Biokimia mengacu pada kunci determinasi W. Chun and A.K. Vidaver dalam Schaad *et al.*, (2001).

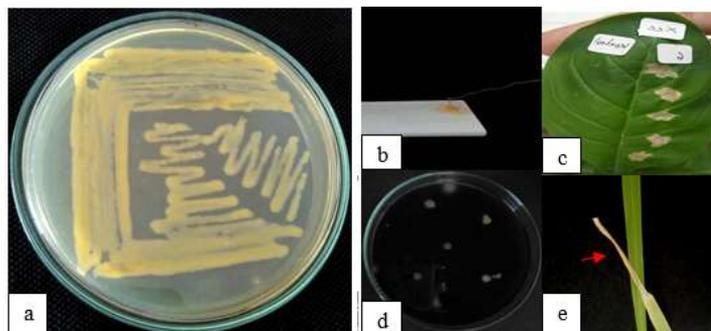
HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi dan Karakteristik Isolat Patogen

Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo).

Hasil peremajaan isolat patogen Xoo menunjukkan morfologi koloni berwarna kuning, berbentuk bulat dengan permukaan koloni licin dan diperoleh bakteri dengan karakteristik bakteri Gram negatif, bersifat patogen, tidak dapat menghidrolisa pati, dan bersifat virulen

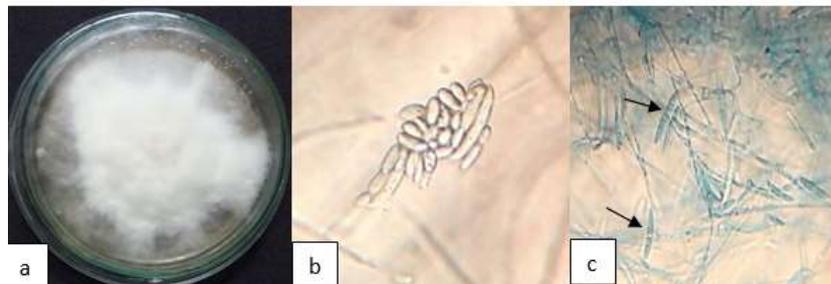
Menurut Ou (1985), *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk batang pendek dan koloni berwarna kekuningan. Hasil penelitian Bahtiar *et al.*, (2017) menunjukkan karakteristik koloni berwarna kuning, tidak dapat menghidrolisa pati, dan bersifat Gram negatif yaitu penyebab hawar daun bakteri (HDB) pada padi di daerah Mumbulsari, Jember.



Gambar 1. Morfologi koloni Xoo pada media YPGA (a), uji gram (b), uji hipersensitif (c), uji pati (d), dan uji patogenitas(e).

Fusarium sp.

Hasil peremajaan cendawan *Fusarium* sp. yang ditumbuhkan kembali pada media PDA menunjukkan morfologi miselium berwarna putih seperti kapas dengan pertumbuhan ke atas. Identifikasi secara mikroskopis dengan perbesaraan 400x diperoleh ciri-ciri *Fusarium* sp. yang terdiri dari mikro dan makrokonidia, seperti pada gambar di bawah ini:



Gambar 2. Miselium cendawan *Fusarium* sp. pada media PDA (a), mikro konidium (b), dan makro konidium(c).

Berdasarkan gambar di atas, miselium *Fusarium* sp. berwarna putih seperti kapas dengan pertumbuhan ke atas. Mikro konidia yang dimiliki berbentuk lonjong, sementara makro konidia berbentuk seperti bulan sabit, melengkung dan memiliki sekat. Hal ini sesuai dengan ciri-ciri *Fusarium* yang dikemukakan oleh Juniawan (2015) bahwa *Fusarium* membentuk dua jenis spora seksual yaitu, mikro konidium dan makro konidium. Spora mikrokonidium bersel tunggal, tidak bersekat, tidak berwarna dan berdinding tipis dengan bentuknya bulat telur sampai lurus. Sementara makro konidium bentuknya lancip dengan ujung melengkung seperti bulan sabit, dan bersekat. Pada media mula-mula miselium berwarna putih semakin tua warna menjadi krem atau kuning pucat.

Pengambilan Sampel di Lapang

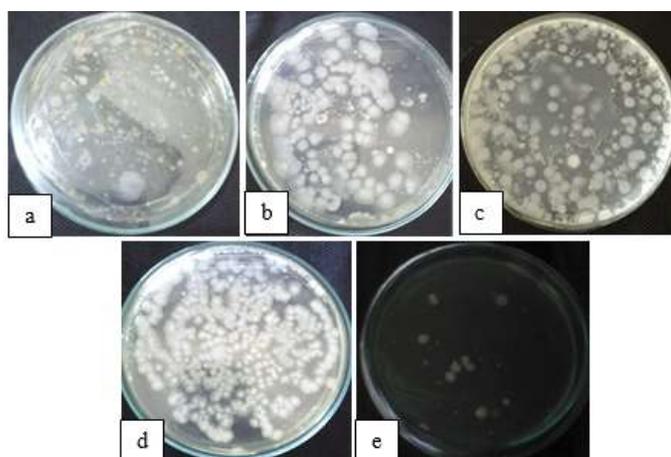
Lokasi pengambilan sampel dilakukan di Kecamatan Kalisat, Kabupaten Jember dengan memilih tiga lahan yang berbeda secara acak yaitu, lahan tanaman padi, cabai, dan jagung. Dari ketiga lahan tersebut gulma dominan yang diperoleh disajikan dalam tabel berikut.

Tabel 1. Inventarisasi Gulma di Lapang.

Asal Lahan	Gulma	Golongan
Padi	<i>Limnocharis flava</i>	Daun lebar
	<i>Mimosa pudica</i> L	Daun lebar
	<i>Cyperus rotundus</i>	Teki
Cabai	<i>Portulaca ocellaracea</i>	Daun lebar
Jagung	<i>Eleusine indica</i>	Rumput

Isolasi dan Seleksi Bakteri Asal Rhizosfer Gulma

Karakteristik Bakteri hasil Isolasi



Gambar 3. Hasil isolasi rhizosfer gulma *Eleusine indica* (a), *Portulaca olerace* (b), *Limnocharis flava* (c), *Cyperus rotundus* (d), dan *Mimosa pudica* (e) pada media NA

Berdasarkan hasil isolasi pada perakaran lima jenis gulma (*Mimosa pudica*, *Eleusine indica*, *Portulaca oclaracea*, *Cyperus rotundus*, dan *Limnocharis flava*), morfologi koloni bakteri yang tumbuh pada media menunjukkan karakteristik koloni yang bermacam-macam (gambar 3). Isolasi pada gulma *Eleusine indica* (3a) memiliki karakteristik koloni yang beragam. Karakteristik bakteri yang mendominasi berwarna kuning dengan tepi yang tidak rata. Bakteri tersebut diduga kuat bukan bagian dari *Bacillus*. Hasil isolasi pada perakaran *Portulaca oclarea* (3b) memiliki morfologi berwarna putih, tepi tidak rata, dengan pertumbuhan koloni yang cepat. Pada perakaran gulma *Limnocharis flava* (3c) dan *Cyperus rotundus* (3d) morfologi koloni memiliki karakteristik yang hampir sama, yaitu berwarna putih kusam, koloni bulat, permukaan kasar dengan tepi yang sebagian besar tidak rata. Sementara itu, morfologi koloni hasil isolasi pada perakaran *Mimosa pudica* (3e) warna koloni berwarna putih susu, dengan tepi rata, dan permukaan licin

Pengujian Gram dan Total Populasi Bakteri

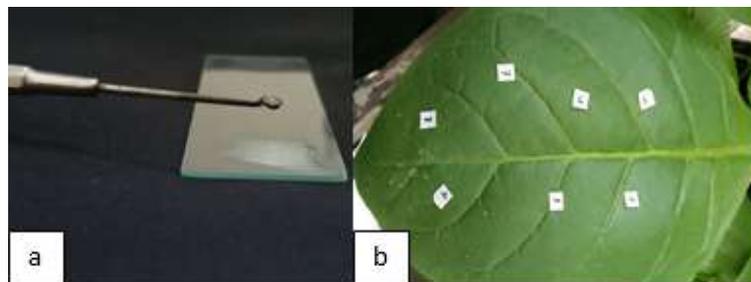
Berdasarkan hasil pengujian Gram, bakteri yang menunjukkan sifat Gram positif memiliki jumlah populasi yang berbeda-beda asal masing-masing rhizosfer. Populasi bakteri terbanyak berasal dari perakaran gulma *Cyperus rotundus* dengan nilai mencapai $24,6 \times 10^5$ cfu/gr. Sebanyak 17 isolat yang berhasil dimurnikan terdiri dari 8 isolat asal perakaran *Mimosa pudica*, 3 isolat asal perakaran gulma *Cyperus rotundus*, serta masing-masing 2 isolat dari perakaran gulma *Eleusine indica*, *Portulaca oclarea*, dan *Limnocahris flava* (Tabel 2).

Tabel 2. Total Populasi Bakteri Asal Rhizosfer Gulma

Asal Rhizosfer	Kode Isolat	Jumlah Isolat	Total Populasi Bakteri Gram Positif (cfu/gr)
<i>Limnocharis flava</i>	B1	2	$10,5 \times 10^4$
<i>Cyperus rotundus</i>	Bt	3	$24,6 \times 10^5$
<i>Mimosa pudica</i>	Bpm	8	$6,8 \times 10^4$
<i>Eleusine indica</i>	Be	2	$8,6 \times 10^4$
<i>Portulaca oleracea</i>	Bp	2	16×10^5

Pengujian Hipersensitif

Berdasarkan hasil uji hipersensitif terhadap 17 isolat yang berhasil dimurnikan menunjukkan reaksi negatif yaitu, tidak munculnya gejala nekrosis pada daun tembakau. Hal tersebut menandakan bahwa bakteri yang ditemukan berpeluang digunakan sebagai agens hayati.

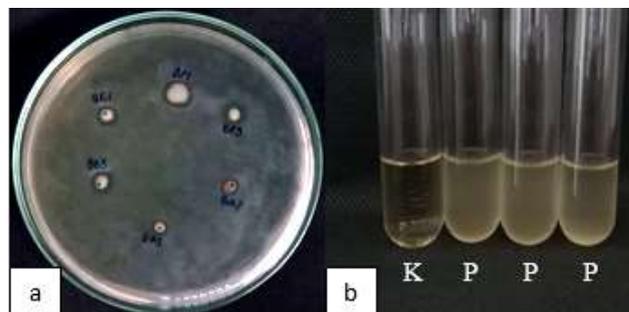


Gambar 4. Pengujian gram (a), dan uji hipersensitif yang menunjukkan reaksi negatif (b).

Potensi *Bacillus* spp. Sebagai Agens Hayati Patogen Tanaman Secara *In vitro*

Daya Hambat *Bacillus* spp. terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae*

Berdasarkan hasil pengujian daya hambat terhadap 17 isolat yang ditemukan, diketahui 14 isolat diantaranya mampu menghambat patogen *X. oryzae* pv. *oryzae* dengan besar hambatan mencapai 14 mm yang berasal dari isolat Bpm3. Besarnya daya hambat bakteri uji terhadap patogen *X. oryzae* pv. *oryzae* dapat dilihat pada tabel 3 di bawah ini:



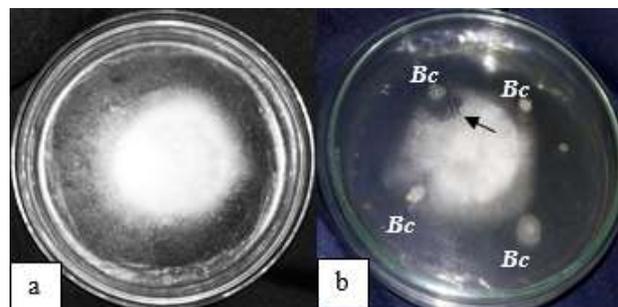
Gambar 5. Zona bening yang terbentuk oleh *Bacillus* spp. terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae* (a), dan mekanisme penghambatan *Bacillus* spp. pada medium pepton 1% (b).

Tabel 3. Zona Hambat *Bacillus* spp. Terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae*

Isolat	Diameter hambatan (mm)	Mekanisme hambatan
Bpm1	9,5	Bakteriostatik
Bpm2	5,0	Bakteriostatik
Bpm3	14	Bakteriostatik
Bpm4	6,5	Bakteriostatik
Bpm5	-	-
Bpm6	1,0	Bakteriostatik
Bpm7	8,5	Bakteriostatik
Bpm8	-	-
Bt3	9,5	Bakteriostatik
Bt5	12	Bakteriostatik
Bt9	8,0	Bakteriostatik
Bp1	5,0	Bakteriostatik
Bp9	12	Bakteriostatik
Be1	5,5	Bakteriostatik
Be3	3,5	Bakteriostatik
Bl3	7,0	Bakteriostatik
Bl7	10	Bakteriostatik

Daya Hambat *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* sp.

Berdasarkan hasil uji antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* sp. menunjukkan adanya pertumbuhan hifa *Fusarium* yang terhambat disekitar koloni bakteri.



Gambar 6. Pertumbuhan cendawan *Fusarium* sp. tanpa *Bacillus* (a), dan pertumbuhan hifa *Fusarium* sp. yang menjauhi koloni *Bacillus* spp. (b).

Tabel 4. Zona Hambat *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* sp.

Perlakuan	Pertumbuhan Jari-jari (cm ²) / HSI					Zona Hambat (%)
	1	2	3	4	5	
Kontrol	0,8	1,4	2,6	3,3	3,8	-
BPM1	0,3	0,6	1,0	1,2	1,4	63,15
BPM2	0,5	0,8	1,1	1,5	1,8	52,63
BPM3	0,3	0,5	0,9	1,3	1,6	57,89
BPM4	0,2	0,5	0,8	0,9	1,3	65,78
BPM5	0,3	0,4	0,8	1,1	1,5	60,52
BPM6	0,3	0,5	0,9	1,3	1,4	63,15
BPM7	0,4	0,6	0,9	1,2	1,3	65,78
BPM8	0,3	0,7	1,0	1,4	1,6	57,89
BT3	0,5	0,7	1,0	1,3	1,5	66,66
BT5	0,6	1,0	1,2	1,3	1,5	60,52
BT9	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	63,15
BP1	0,5	0,7	1,0	1,3	1,4	63,15
BP9	0,2	0,5	0,7	1,0	1,2	68,42
BE1	0,4	0,8	1,3	1,5	1,7	55,26
BE3	0,3	0,4	0,7	0,9	1,0	73,68
BL3	0,3	0,6	0,9	1,1	1,3	63,15
BL7	0,4	0,5	0,8	1,0	1,3	65,78

Berdasarkan uji daya hambat, kemampuan *Bacillus* spp. dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp. mencapai 73% yang berasal dari isolat Be3. Presentase tersebut menunjukkan bahwa *Bacillus* berpeluang digunakan sebagai agens hayati dalam menghambat cendawan patogen.

Karakterisasi *Bacillus* Secara Fisiologi dan Biokimia

Berdasarkan hasil pengujian identifikasi terhadap 5 isolat unggul yaitu, B17, Bt5, Bpm3, Bp9, dan Be3 menunjukkan hasil yang bervariasi dari masing-masing isolat (Tabel 5). Umumnya karakteristik isolat uji menunjukkan ciri-ciri, mampu menghidrolisa pati, memproduksi enzim katalase, dapat tumbuh pada suhu 45°C dan pH 5,7.

Tabel 5. Hasil pengujian terhadap isolat unggul

Identifikasi	Kode Isolat					Schaad et al., 2001			
	BPM03	BE03	BT05	BL07	BP09	<i>licheniformis</i>	<i>subtilis</i>	<i>alvei</i>	<i>coagulans</i>
Reaksi Gram	+	+	+	+	+	+	+	I	+
Pertumbuhan pada media cair:									
Suhu 45°C	+	+	+	+	+	+	+	V	+
pH 5,7	+	+	++	-	+	+	+	-	+
NaCl 7 %	+	+	-	-	++	+	+	-	-
Anaerobik	+	-	++	+	+	+	-	+	+
Reaksi Pembentukan Asam:									
Sukrosa	+	+	+	+	+	NT	NT	NT	NT
Glukosa	+	+	++	+	+	NT	NT	NT	NT
Manitol	+	+	+	-	+	+	+	-	V
Hidrolisis Pati	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	NT
Oksidatif-fermentatif	+	+	-	+	++	NT	NT	NT	NT
Reaksi Hipersensitif	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: + positif terbentuk, ++ positif kuat, *)positif lemah, - negatif, NT = not test (W. Chun and A.K. Vidaver dalam Schaad et al., 2001)

PEMBAHASAN

Pengambilan sampel tanah dilakukan di Kecamatan Kalisat Kabupaten Jember dengan memilih tiga lokasi lahan yang berbeda yaitu, lahan padi, lahan jagung, dan lahan tanaman cabai. Pada lokasi sampling pertama ditemukan beberapa gulma utama, diantaranya *Cyperus rotundus*, *Limnocharis flava* (genjer), serta *Mimosa pudica* L. yang umumnya banyak tumbuh liar disekitar lahan. Mimosa termasuk gulma *leguminoceae*, berupa perdu dan umumnya tumbuh pada lingkungan terbuka. Tanaman *leguminoceae* mampu menghasilkan zat metabolit sekunder berupa senyawa kimia yang dikeluarkan akar dan merangsang dalam perkembangan bakteri. Senyawa tersebut dapat merangsang mikroba tanah diantaranya genus *Bacillus* sp. (Mukamoto, 2015). Lokasi sampling kedua, ditemukan gulma *Portulaca ocellaracea* L. yang mendominasi lahan tanaman cabai. Gulma ini memiliki nama daerah “krokot” yang termasuk ke dalam gulma daun lebar dengan pertumbuhan akar menancap kuat pada tanah. Sementara

itu, pada lokasi sampling ketiga banyak ditemukannya gulma *Eleusine indica* yang termasuk ke dalam suku rumput-rumputan. Hasil penelitian Estuningsih *et al.* (2015), terdapat 5 genus bakteri yaitu, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, dan *Acinobacterium* yang berhasil diisolasi dari bioreaktor yang ditanami *Eleusine indica*.

Berdasarkan hasil isolasi, adanya perbedaan jumlah populasi dari masing-masing rhizosfer diduga karena adanya perbedaan eksudat akar yang dikeluarkan oleh masing-masing tanaman. Hardestyariki (2013) menyatakan, setiap tanaman mengeluarkan eksudat akar dengan komposisi yang berbeda-beda sehingga berperan dalam penyeleksi mikroba. Hal tersebut mengakibatkan adanya dinamika populasi mikroba dalam tanah. Semakin banyak eksudasi akar yang dikeluarkan, akan semakin besar jumlah dan keragaman mikroba. Faktor lainnya, yang mempengaruhi keberadaan mikroba dalam tanah diantaranya adalah vegetasi, bahan organik, iklim daerah, reaksi yang berlangsung, serta kadar nutrisi eksudat.

Struktur sel yang kuat pada *Bacillus* menjadikan bakteri ini termasuk ke dalam gram positif pada pengujian gram. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tahan terhadap larutan KOH sehingga DNA tidak keluar membentuk benang-benang lendir (Shivas dan Beasley dalam Hajjah, 2016). Sifat utama yang membedakan *Bacillus* dari bakteri pembentuk endospora lainnya adalah kemampuan *Bacillus* untuk hidup aerob (walaupun beberapa diantaranya bersifat fakultatif anaerob) dan mayoritas jenisnya memproduksi katalase. Hal tersebut dibuktikan dengan terbentuknya gelembung (busa) pada pemberian H₂O₂. Pada pengujian katalase, menunjukkan bahwa bakteri mampu mengurai hidrogen peroksida (H₂O₂) yang bersifat toksik bagi tubuhnya dengan memproduksi enzim katalase menjadi O₂.

Berdasarkan hasil pengujian antagonis *Bacillus* spp. dengan *X. oryzae* pv. *Oryzae*, 15 isolat diantaranya menunjukkan adanya daya hambat terhadap patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri. Zona hambat terbesar berasal dari isolat Bpm3 sebesar 14 mm. Zona hambat terbentuk karena bakteri antagonis mengeluarkan senyawa antimikrobal sebagai bentuk pertahanan. Menurut Hajjah (2016), *Bacillus* spp. mampu berperan sebagai agens hayati patogen tanaman melalui mekanisme antibiosis dengan menghasilkan senyawa penghambat (senyawa antimikrobal) diantaranya antibiotik, peptida, senyawa fenol, dan enzim, alkaloid, dan siderofor. Dwidjoseputro (1985) menambahkan, strain *B. subtilis* mampu menghasilkan antibiotik berupa bacticin dan subtilin. Penelitian Wati (2017) melaporkan, bahwa *Bacillus* mampu menghambat patogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* penyebab busuk hitam pada kubis dengan mengeluarkan senyawa antimikrobal yang dipengaruhi oleh spesies bakteri dari genus *Bacillus*.

Hasil pengujian mekanisme hambatan yang dilakukan dengan menggunakan media pepton 1%, berubah menjadi keruh. Hal ini menunjukkan tipe mekanisme hambatan bakteri tersebut adalah bakteriostatik. Bakteriostatik adalah sifat antibiotik yang hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri (patogen), sementara pada media pepton yang tidak keruh menunjukkan mekanisme hambatan merupakan bakteri bakteriosidal, yaitu sifat antibiotik yang dapat membunuh bakteri (patogen) dan bersifat menetap. Waluyo (2010) menambahkan, bahan antimikrobia dapat bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah, dan dapat bersifat bakteriosidal pada konsentrasi tinggi.

Pada pengujian antagonisme *Bacillus* dengan *Fusarium* sp. menunjukkan bahwa *Bacillus* mampu menekan pertumbuhan cendawan patogen. Semula miselium *Fusarium* sp. tumbuh dengan baik di dalam petri. Akan tetapi pada hari ke-empat dan ke-lima pengamatan, cendawan *Fusarium* sp. berhenti tumbuh di sekitar bakteri. Menurut Liu *et al.*, (2006) dalam Hidayah dan Titiek (2015), kelompok *Bacillus* mampu menghasilkan senyawa antifungi diantaranya adalah inturin A, surfactin, dan bacicubin yang berperan dalam menghambat pertumbuhan cendawan patogen.

Tehrani and widowati (2003) melaporkan bahwa kelompok rhizobakteria merupakan mikroba yang mampu mengantagonis dan memiliki efek pengendali diatas 51 % terhadap patogen tular tanah seperti *F. oxysporum*. Soesanto (2008) menambahkan, keberhasilan pengendalian hayati tergantung kepada mekanisme yang dimiliki oleh agens hayati. Mekanisme utama berupa kompetisi nutrisi, antibiotika, dan kemampuan induksi resistensi serta memacu pertumbuhan tanaman.

Berdasarkan pengujian identifikasi terhadap 5 isolat unggul (Bt5, Bp9, B17, Bpm3, dan Be3) ditemukan ciri-ciri *Bacillus* spp. yang memiliki kemiripan dengan *B. coagulans*, *B. alvei*, *B. subtilis*, dan *B. licheniformis*. Isolat Bpm3 dan Bp9 memiliki nilai positif pada semua uji. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan sifat dari spesies *B. licheniformis*. Menurut Hatmanti (2000) bakteri ini termasuk bakteri termofil dengan kisaran pH luas. Selain itu, *B. licheniformis* termasuk mikroorganisme tanah pembentuk spora yang memberikan kontribusi untuk nutrisi tanah dan aktivitas anti jamur (Soeka, 2011). Isolat Be3 berdasarkan hasil uji tidak mampu tumbuh dalam keadaan anaerobik. Karakter tersebut memiliki kemiripan dengan *B. subtilis*. *B. subtilis* menginginkan tingkat kelembaban tinggi dengan sifat pertumbuhan yang mesofilik. Bakteri ini menghasilkan enzim amilase, kitinase, dan lipase sebagai enzim pengurai dinding sel patogen (Hatmanti, 2000). Isolat Bt5 tidak mampu tumbuh pada media yang mengandung 7% NaCl, diduga isolat Bt5 termasuk ke dalam spesies *B. coagulans*. Menurut Widayati (2013), kondisi optimal untuk bakteri *B. coagulans* terjadi pada pH 6,00 dengan suhu 40°C. Aktivitas

enzim meningkat dengan kenaikan suhu inkubasi. Isolat B17 memiliki kemiripan dengan spesies *B. alvei*. Bakteri ini banyak digunakan sebagai agens hayati terhadap patogen serangga (Hatmanti, 2000).

KESIMPULAN

1. Sebanyak 17 isolat *Bacillus* spp. berhasil diisolasi dari rhizosfer gulma *Cyperus rotundus*, *Limnocharis flava*, *Mimosa pudica*, *Eleusine indica*, dan *Portulaca oleracea*.
2. 17 isolat *Bacillus* spp. yang ditemukan mampu menghambat pertumbuhan cendawan *Fusarium* sp. dengan persentasi hambatan sebesar 73% dan 15 isolat diantaranya mampu menghambat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dengan mekanisme hambatan bakteriostatik.
3. Hasil identifikasi terhadap 5 isolat unggul ditemukan spesies *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, dan *B. coagulans*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, N.E. 2007. Efektifitas Beberapa Isolat *Bacillus* spp. dalam Menghambat *Ralstonia solanacearum* Pada Cabai. Skripsi. Universitas Jember: Jember
- Ambarwati, A., Langkah, S., and C.J. Soegihardjo. 2012. Antibiotic Produced by *Streptomyces* Associated with Rhizosphere of Purple Nut Sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. *J. of Microbiology Research*, Vol. 6(1): Pg 52-57
- Bahtiar, A.S., Suhartiningsih, D.N., dan Rachmi, M. 2017. Keberadaan Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Padi dan Pengendaliannya di Mumbulsari Kabupaten Jember. *J. Pertanian*
- Estuningsih, P.S., Muharni., dan Marindah, R. 2012. Isolasi dan Identifikasi bakteri Hidrokarbon di Sekitar Rumput Belulang (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) yang Berperan dalam Fitoremediasi Limbah Minyak Bumi. *J. Penelitian Sains*, Vol, 15(1): Pg 1-12
- Hajjah, W.S. 2016. Eksplorasi dan Identifikasi Bakteri Agens Hayati Dari Permukaan Tubuh Lundi (*Coleoptera: Scarabaeidae*). Skripsi Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Hardestyariki, D., Bambang, Y., dan Munawar. 2013. Eksplorasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Rhizosfer di Lahan Tambang Minyak Rakyat, Kecamatan Babat Toman, Sumatera Selatan. *J. Penelitian Sains*, 16(3)
- Harwood, C.R., and S.R Cutting. 1990. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. University of Newcastle. John Willey Ltd. England
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Journal of Oseana*, 25(1): Pg 31-41
- Hidayah, N., dan Titiok, Y. 2015. Uji Antagonisme *Bacillus cereus* Terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotium rolfsii*. *Buletin Tembakau*, 7(1): pg 1-8
- Hillocks, R.J. and J.M. Waller. 1997. *Soilborne Diseases of Tropical Crops*. University of Minnesota: CAB International
- Juniawan. 2015. Mengenal Jamur *Fusarium oxysporum*. <http://bbppketindan.bbpsdmp.pertanian.go.id/blog/mengenal-jamur-fusarium-oxysporum>. [serial online]
- Lay. B.W. 1994. *Analisa Mikrobiologi di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada: Jakarta
- Mukamto., Syazwani, U., Weda, M., Ahmad, S., Laila, I., dan Guntur, T. 2015. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus* sp. Pelarut Fosfat dan Rhizosfer Tanaman Leguminosae. *J. Sains*, 3(2); pg 62-68

- Ou, S.H. 1985. *Rice Diseases*. Commonwealth Mycological Institute: UK
- Pscheidt, B.J.W. 2011. *Plant Diseases*. Kentucky Master Gardener Manual Chapter 6. University of Kentucky. Pg 83-94
- Puspita, F., Delita, Z., dan Amrul, K. 2013. Potensi *Bacillus* sp. Asal Rizosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu Sebagai Rhizobacteria Pemacu Pertumbuhan dan Antifungi Pada Pembibitan Kelapa Sawit. *Prosiding Seminar Nasional*, Riau: Pekanbaru
- Putra, C., dan Giyanto. 2014. Kompatibilitas *Bacillus* spp. dan Aktinomiset Sebagai Agens Hayati *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan Pemacu Pertumbuhan Padi. *J. Fitopatologi*, 10(5): pg 160-169
- Schaad, N.W., J.B Jones and W, Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. USA: Onacid. Pg 175-193
- Soeka, S.Y., Sri, H.R., Ninu, S., dan Elidar, N. 2011. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Litbang Kesehatan*, 21(2): pg 89-95
- Soesanto, L (2008). *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. PT Raja Grafindo Perkasa: Jakarta.
- Simatupang, D. 2008. Berbagai Mikroorganisme Rhizosfer Pada Tanaman Pepaya (*Carica papaya* L.) di Pustaka Kajian Buah-buahan Tropika (PKBT) IPB Desa Ciomas, Kec. Pasirkuda, Kab. Bogor, Jawa Barat. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Tehrani, A.S., and Ramenzani. 2003. Pengendalian Penyebab Penyakit Layu Bawang Merah dengan Menggunakan Bakteri Antagonis *Commun. J. Agri*, 68(4): Universitas Teheran: Karaj, Iran.
- Waluyo L. 2010. *Tekhnik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Malang: UMM Press
- Wardika, M.C., Suryanti., dan Tri Joko. 2014. Eksplorasi Bakteri yang Berpotensi Sebagai Agens Pengendali Hayati *Fusarium solani* dan *Meloidogyne incognita* Pada Lada. *J. Perlindungan Tanaman*, 18(2): pg 89-94
- Wati, T.A.F.D. 2017. Efektifitas *Bacillus* spp. Sebagai Agen Pengendali Hayati Busuk Hitam *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pada Kubis. Skripsi: Universitas Jember: Jember
- Widyati, E. 2013. Dinamika Komunitas Mikroba di Rhizosfer dan Kontribusinya Terhadap Pertumbuhan Tanaman Hutan. *J. Tekno Hutan Tanaman*, 6(2): Pg 55-64