

**ABSTRAK DAN EXECUTIVE SUMMARY  
PENELITIAN DISERTASI DOKTOR**



**IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI HAWAR DAUN EDAMAME  
DAN PENGENDALIANNYA DENGAN PLANT GROWTH  
PROMOTING RHIZOBACTERIA SECARA IN VITRO**

**Tahun ke 1 (satu) dari rencana 1 (satu) tahun**

**PENELITI**

**Ir. Rachmi Masnilah, M.Si  
NIDN: 0002016305**

**UNIVERSITAS JEMBER  
Desember, 2013**

# **Identifikasi Molekuler Bakteri Hawar Daun Edamame dan Pengendaliannya dengan Plant Growth Promoting Rhizobacteria Secara In Vitro**

Peneliti : Rachmi Masnilah<sup>1</sup>  
Mahasiswa Terlibat : -  
Sumber Dana : Hibah Penelitian Desentralisasi UPDD Tahun Anggaran 2013

<sup>1</sup> Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember

## **ABSTRAK**

Penyakit hawar daun bakteri merupakan penyakit baru pada edamame, karena belum dilaporkan keberadaannya di Indonesia, oleh karena itu perlu identifikasi secara molekuler untuk memastikan identitas patogennya. Penyakit ini muncul sejak tahun 2003 dan menyebabkan kerugian yang cukup signifikan dalam budidaya edamame, sehingga diperlukan alternatif pengendalian yang ramah lingkungan yaitu pengendalian hayati dengan pemanfaatan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) yaitu bakteri perakaran yang dapat memicu pertumbuhan tanaman karena dapat berperan sebagai bioprotektan, biofertilizer, dan biostimulan. Tujuan penelitian ialah: (1) Mengetahui karakteristik fisiologi dan molekuler bakteri penyebab penyakit hawar daun pada edamame (khususnya di Jember); (2) Mengetahui keragaman jenis isolate PGPR di sentra pertanaman edamame (khususnya di daerah Jember); dan (3) Mendapatkan isolate PGPR yang potensial mengendalikan bakteri hawar daun pada edamame secara in vitro di laboratorium melalui mekanisme antibiosis. Metode penelitian yang dilakukan ialah: (1) Survey dan pengambilan sampel tanaman sakit (hawar daun bakteri) dan tanah beserta akar di rhizosfer edamame (PGPR) secara purposive dengan metode stratifikasi; (2) Isolasi bakteri hawar daun pada medium Kings B, determinasi isolate secara fisiologi/fenotipik, uji patogenisitas dan virulensi pada tanaman inang; (3) Identifikasi molekuler yang meliputi isolasi DNA genom, Box PCR, PCR pengkode 16S rRNA, sekuen gen 16S rRNA, program BLAST; (4) Isolasi PGPR pada media Kings B, TSA dan YPGA; dan (5) Skrining daya hambat PGPR terhadap bakteri hawar daun edamame

secara *in vitro* dengan metode *Dual Plating*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa: (1) Bakteri penyebab penyakit hawar daun edamame di Jember (Panti, Sukorambi, Wirolegi, Ajung, dan Sumbersari) ialah *Pseudomonas syringae pv.glycinea* yang bersifat gram negatif, mampu membentuk pigmen fluoresen pada medium king B, mampu tumbuh baik pada kisaran suhu 20-40<sup>0</sup> C, mempunyai kisaran pH 4,5-8,5, toleran pada kandungan NaCl 0,5-2%, serta bersifat pathogen dan virulen pada tanaman edamame, (2) Identifikasi molekuler bakteri hawar daun edamame berdasar gen pengkode 16S rRNA, pada PCR dengan primer 27f-907r dan 533f-1427r telah berhasil mengamplifikasi gen pengkode 16S rRNA pada 4 isolat (Psg 25, Psg 26, Psg 28, Psg 32), produk PCR sudah berhasil dipurifikasi dan dikonfirmasi panjang basa sesuai dengan ekspektasi.(3) Berdasarkan pengujian antibiosis terhadap bakteri hawar daun edamame dari 197 isolat *Bacillus* spp. terdapat 14 isolat yang memiliki sifat antagonis terhadap bakteri hawar daun edamame , 169 isolat *Pseudomonad fluorescens* terdapat 12 isolat yang menghambat bakteri hawar daun edamame dan dari 104 isolat Actinomycetes, terdapat 18 isolat yang dapat menghambat bakteri hawar daun edamame. Zona hambatan bakteri antagonis terhadap bakteri daun edamame bervariasi antara 0,5 mm sampai dengan 40 mm.

**Kata Kunci : Bakteri hawar daun, Kedelai edamame, PGPR**

## **Identifikasi Molekuler Bakteri Hawar Daun Edamame dan Pengendaliannya dengan Plant Growth Promoting Rhizobacteria Secara In Vitro**

Peneliti : Rachmi Masnilah<sup>1</sup>  
Mahasiswa Terlibat : -  
Sumber Dana : Hibah Penelitian Desentralisasi UPDD Tahun Anggaran 2013  
Kontak Email : [rachmimasnilah@gmail.com](mailto:rachmimasnilah@gmail.com)  
Diseminasi : belum ada

<sup>1</sup> Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember

### **Latar Belakang dan Tujuan Penelitian**

Penyakit hawar daun bakteri merupakan penyakit baru pada edamame, penyakit ini muncul sejak tahun 2003 dan menyebabkan kerugian yang cukup signifikan dalam budidaya edamame. Sampai sekarang ini identifikasi bakteri hawar daun kedelai yang pernah dilakukan hanya terbatas pada benih bak secara fenotopik (Asrul, 2007) maupun secara serologi (Suryadi dan Machmud, 2006). Untuk itu perlu dilakukan identifikasi pada tanaman yang terinfeksi bakteri hawar daun baik secara fenotopik maupun molekuler. Identifikasi bakteri patogen secara fenotopik penting untuk mendapatkan gambaran tentang bakteri patogen seperti morfologi sel dan koloni maupun karakter fisiologi dan biokimianya (Schaad, 2001). Selain analisis fenotopik, analisis secara molekuler perlu dilakukan untuk konfirmasi identifikasi secara non molekuler yang telah dilakukan.

Usaha pengendalian yang telah dilakukan nampaknya belum menunjukkan hasil yang optimal, hal ini terlihat dari masih tingginya kejadian penyakit di lapangan. Oleh karena itu, alternatif pengendalian secara biologi perlu dipertimbangkan dan merupakan peluang untuk dikembangkan dalam menekan bakteri hawar daun pada edamame. Pengembangan agens biokontrol (agens hayati) sebagai komponen pengendalian bakteri hawar daun secara terpadu yang ramah lingkungan perlu dikembangkan dan diharapkan menjadi alternatif pengendalian yang penting dalam era pertanian yang berkelanjutan. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) ialah kelompok mikroorganisme tanah yang menguntungkan dari golongan bakteri yang hdiup dan berkembang dengan baik pada tanah yang kaya akan bahan organik (Compant *et al.*, 2005). Bakteri ini diketahui aktif mengkolonisasi akar tanaman dan memiliki 3 peran utama bagi tanaman ialah sebagai biofertilizer, biostimulan dan bioprotektan

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dikaji potensi bakteri PGPR dalam memperoleh isolate indogenus dan menemukan sumber keanekaragaman hayati baru yang berpotensi untuk mengendalikan penyakit hawar daun bakteri

Tujuan Penelitian ialah (1) Mengetahui karakteristik fisiologi dan molekuler bakteri penyebab penyakit hawar daun pada edamame (khususnya di Jember) (2) Mengetahui keragaman jenis isolat PGPR di sentra pertanaman edamame (khususnya di daerah Jember) (3) Mendapatkan isolate PGPR yang potensial mengendalikan bakteri hawar daun pada edamame di secara invitro di laboratium melalui mekanisme antibiosis

## **Metodologi Penelitian**

### **Eksplorasi , Isolasi dan Identifikasi fenotipik Bakteri Hawar Daun Edamame**

Eksplorasi bakteri penyebab penyakit hawar daun bakteri pada edamame dilakukan dengan metode survey dan pengambilan sampel tanaman yang menunjukkan gejala hawar daun bakteri. Penentuan lokasi survey dan pengambilan sampel dilakukan secara purposive dengan metode stratifikasi di wilayah kabupatrn Jember. Untuk mendapatkan isolat patogen hawar daun bakteri pada edamame dilakukan uji Postulat Koch yang meliputi kegiatan isolasi, determinasi, dan uji virulensi. **Isolasi** dilakukan dengan metode penanaman jaringan tanaman sakit pada medium Kings B. dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. **Determinasi** bakteri hawar daun edamame dilakukan dengan melakukan serangkaian pengujian fisiologis dan biokomianya yang meliputi: (1). Pengujian Gram, (2) Reduksi Hidrogen Peroksidase (Katalase), (3) Pengujian Oksidatif Fermentatif (OF), (4). Hidrolisis Pati, (5) Pencairan Gelatin, (6) Produksi Indol, (7) Reduksi Nitrat, (8) Pembentukan Asam, (9) Uji Produksi Levan, (11) Pengujian Pembusukan Kentang, (12) Pengujian Arginin Dehidrolase, (13). Pengujian Hipersensitif (HR) pada daun Tembakau. **Uji virulensi** menggunakan daun kedelai yang diinokulasi dengan metode pelukaan pada daun, kemudian suspensi isolate bakteri hawar daun disemprotkan pada daun tersebut.

### **Identifikasi molekuler Bakteri hawar daun edamame dengan 16S rRNA**

**Isolasi DNA genom** bakteri dilakukan dengan metode Freeze and Thaw (modifikasi dari Tsai dan Olson, 1991). Kualitas DNA genom dapat dilihat melalui elektroforesis yaitu dengan menambahkan 1 ul loading dye pada 5 ul supernatan, kemudian dimasukkan dalam sumuran gel yang mengandung EtBr. DNA ladder 1 kb digunakan sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada 80 V dengan buffer TBE sebagai running buffer. Gel dapat divisualisasi dengan meletakkn gel diatas UV eluminator untuk melihat

ada tidaknya pita DNA genom. **Box PCR untuk Menjaga Kemurnian dan Stabilitas Profil Genom Isolat**, isolat bakteri yang terlihat pita DNA genomnya diamplifikasi melalui BOX PCR dengan menggunakan primer BOX AIR (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G3, Oda et al. 2002). Produk PCR dapat dilihat melalui elektroforesis, Visualisasi gel dapat dilakukan dengan meletakkannya pada UV gel eluminator. **PCR DNA pengkode 16S rRNA**, isolat bakteri yang terlihat pita DNA genomnya diamplifikasi dengan menggunakan primer DNA pengkode 16S rRNA yaitu 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3), 533F (5' GTG CCA GCM GCC GCG GTAA 3), dan 907R (5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3), 1492 (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3) (Lane, 1991). Sebelum sekuensing kualitas dari produk PCR dilihat melalui elektroforesis. DNA ladder 100 bp digunakan sebagai marker. Jika hasil elektroforesis tersebut memuaskan yaitu pita DNA terlihat jelas dan tidak ada pita yang tercampur, maka dilakukan pemurnian produk hasil PCR. **Purifikasi DNA Hasil PCR**, pProduk PCR dimurnikan mengikuti prosedur PCR clean-up Gel Extraction Nucleospin. **Analisis Sekuen DNA pengkode 16S rRNA**, penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakuakn dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk PCR ke GTAC Germany digunakan untuk analisis data kasar sekuensing. Setelah diketahui aligment sekuen DNA pengkode 16S rRNA menggunakan BLAST online software ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).) untuk menentukan spesies dari isolat dan hubungan kekerabatan dengan spesies bakteri lainnya.

### **Eksplorasi, Isolasi dan skrining PGPR Secara in vitro**

**Eksplorasi** dilakukan untuk mendapatkan bakteri perakaran yang berpotensi sebagai PGPR. Sampel tanah dikoleksi dari tempat yang tertutup vegetasi dipertanaman edamame. Akar beserta tanah disekitar perakaran (rhizosfer) diambil dan dimasukkan ke dalam kantong plastik dan segera dibawa ke Laboratorium. Apabila tidak langsung di uji, sampel disimpan pada suhu 4°C. **Isolasi** dilakukan baik dari sampel tanah rhizosfer tanaman maupun dari jaringan akar tanaman edamame pada tanah supresif. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran berseri. Sebanyak 1 ml cairan lumatan akar kemudian diratakan pada medium King's B, YME dan TSA dan diinkubasikan hingga 2 hari pada suhu ruang. Koloni tunggal yang tumbuh kemudian pindahkan pada medium yang sama. **Skrining PGPR dalam mengendalikan bakteri hawar daun edamame secara in vitro laboratorium**, Skrining dilakukan untuk memperoleh isolat PGPR hasil isolasi yang memiliki potensi sebagai bioprotektan (kemampuan mengendalikan patogen tanaman) melalui mekanisme antibiosis. Pengujian antibiosis terhadap bakteri hawar daun edamame dilakukan dengan metode *Dual*

*Plating*. Untuk mengetahui mekanisme penghambatan, agar yang berada dalam zona hambatan diambil secara aseptis dengan skalel steril kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 1% air pepton dan dihancurkan dengan jarum preparat. Air pepton berisi agar kemudian digojok menggunakan *rotary shaker* selama 24 jam pada suhu 30 °C.

## **Hasil Penelitian**

### **Karakteristik Fenotipik Bakteri Hawar Daun Edamame**

Berdasarkan hasil survey dan pengamatan lapangan di beberapa lokasi di Jember (Panti, Sukorambi, Wirolegi, Ajung, dan Sumbersari), semua contoh tanaman sakit yang diamati menunjukkan gejala yang hampir sama. Gejala berupa daun-daun yang tampak terdapat bercak tembus cahaya, berwarna coklat tua dikelilingi oleh halo klorotik dan kebasah-basahan. Gejala dapat terjadi pada batang, tangkai daun dan polong. Isolat bakteri yang ditumbuhkan pada medium King B menunjukkan adanya persamaan karakteristik pertumbuhan koloni, yaitu koloni berbentuk bulat, halus, bening dengan tepi sedikit bergelombang dan memproduksi pigmen fluoresen, hal ini terlihat saat biakan bakteri disinari lampu ultra violet (UV) menghasilkan warna hijau berpendar sehingga digolongkan sebagai bakteri pendar fluor. Berdasarkan uji fisiologi isolat bakteri hawar daun edamame memberikan reaksi negatif pada pengujian gram, hidrolisis pati, fermentatif, pencairan gelatin, pembusukan kentang dan arginine dehidrolase. Untuk uji fisiologis yang menghasilkan reaksi positif ialah oksidatif, katalase, reduksi nitrat, produksi levan, produksi indol dan hipersensitifitas pada tembakau. Hasil uji tersaji pada Tabel 1.

Isolat bakteri terbukti bereaksi positif dapat menginfeksi tanaman edamame berdasarkan uji virulensi pada tanaman inang tersebut. Reaksi positif ditunjukkan dengan timbulnya gejala bercak nekrotik berwarna coklat yang dikelilingi dengan halo yang berwarna kuning sampai oranye dengan masa inkubasi bervariasi antara 3-5 hari setelah inokulasi. Berdasarkan pengujian sifat fisiologis dan biokimia tersebut maka isolat bakteri uji identik dengan *P. syringae* pv. *glycinea*.

**Tabel 1.** Karakteristik Sifat Fisiologis dan Biokimia Bakteri Penyebab Penyakit Hawar Daun Edamame (*P. syringae* pv *glycinea*) Isolat asal Jember dibandingkan dengan karakteristik dari Lelliot dan Stead (1987); Schaad (1988); Schaad (2001) dan Asrul (2007)

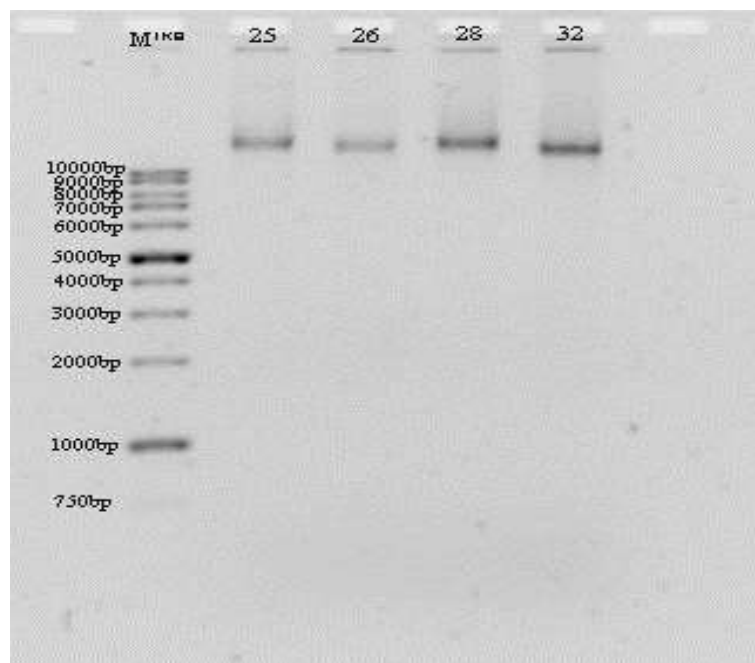
No	Jenis Pengujian	Isolat Asal Jember	Karakteristik <i>P. syringae</i> pv. <i>Glycinea</i>			
			Lelliot dan Stead (1987)	Schaad (1988)	Schaad (2001)	Asrul (2007)
1	Gram	-	-	-	-	-
2	Katalase	+	+			
3	Pigmen fluoresen	+	+	+	+	+
4	Oksidatif	+	+			+
	Fermentatif	-	-	-	-	-
5	Hidrolisis pati	-	-			
6	Pencairan gelatin	+				+
7	Pemanfaatan sumber karbon					
	- sucrose	+		V+		+
	- glucose	+				+
	- dekstrose	+				
	- manitol	+		V+	+	
	- sorbitol	+		-	+D	
8	Reduksi nitrat	+				+
9	Indol	+				
10	Levan Sukrose	+	+	+	+	+
11	Pembusukan Kentang	-	-	-	-	-
12	Arginin dehidrolase	-	-	-	-	-
13	Hipersensitif pada daun tembakau	+	+	+	+	+
14	Suhu (c)					
	5	-				
	20	+				
	25	+				
	40	+				+
	44	-				
15	NaCl (%)					
	0,5	+				+
	1,5	+				+
	2	+				+
	2,5	-				-
16	pH media					
	4	-				-
	4,5	+				+
	6	+				+
	7	+				+
	8,5	+				+

(+) = reaksi positif; (-) = reaksi negatif, (V+)= 21-79% strain positif, (+D)= 80% strain mengalami perlambatan positif



## Karakteristik Molekuler Bakteri Hawar Daun Edamame

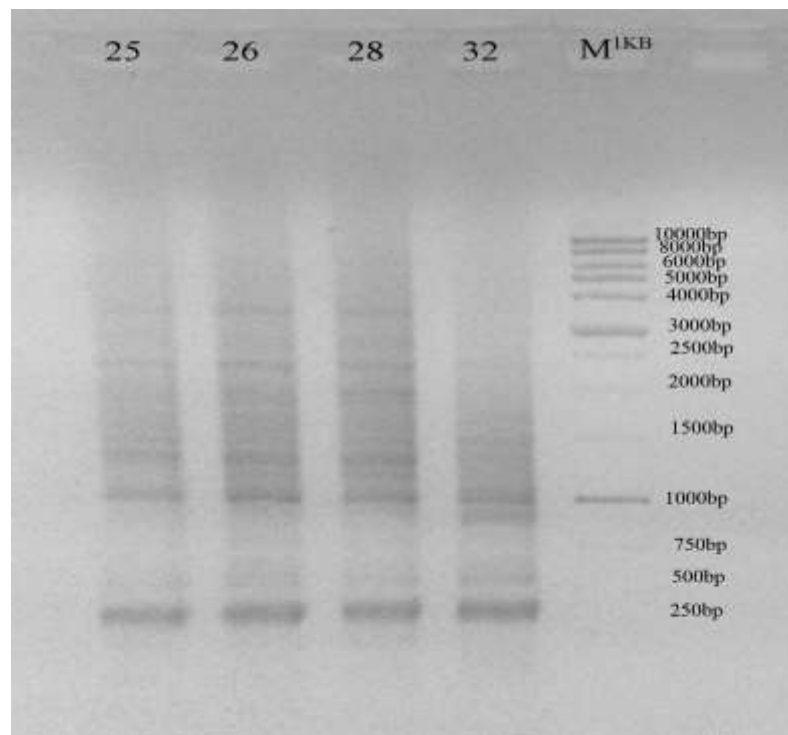
Berdasarkan uji fenotipik (fisiologi dan biokimia) isolat terpilih dari tanaman yang terinfeksi hawar daun edamame, Empat dari delapan isolat diidentifikasi secara molekuler dengan memanfaatkan sekuen 16S rRNA. Untuk keperluan tersebut telah dilakukan isolasi DNA genom sebagai templat dengan menggunakan metode lisis sel secara fisik yaitu dengan metode *freeze and thaw* (Tsai dan Olson, 1991). Hasil isolasi DNA genom yang ditunjukkan pada Gambar 2 memperlihatkan adanya satu pita DNA diatas 10.000 bp jika dibandingkan dengan DNA marker 1 kb. Identifikasi berdasarkan Sekuen DNA pengkode 16S rRNA hanya akan dilakukan terhadap isolat bakteri yang murni yang diindikasikan dengan stabilitas genetik.



**Gambar 1.** Isolasi DNA Genom Bakteri Hawar Daun Edamame

Untuk memastikan kemurnian pada isolat bakteri pilihan maka stabilitas genomnya diamati dengan melihat perbedaan dan/atau kesamaan pola migrasi pita DNA berdasarkan *BOX PCR*. Teknik ini menghasilkan jumlah pita yang lebih jelas dan lebih banyak sehingga terlihat perbedaan yang jelas pada profil pita DNA genom isolat (Savas et al., 2009). *BOX PCR* dilakukan dengan mengamplifikasi DNA genom menggunakan primer *BOX PCR* (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G3). Primer ini akan mempolimerasi sekuen repetitif DNA genom. Sekuen repetitif ditemukan hampir pada semua organisme dan bersifat spesifik pada setiap spesies. Oleh karena itu perbedaan pada profil sekuen repetitif tersebut dapat digunakan untuk menentukan polimorfisme genotip isolat bakteri (Oda et al., 2002)

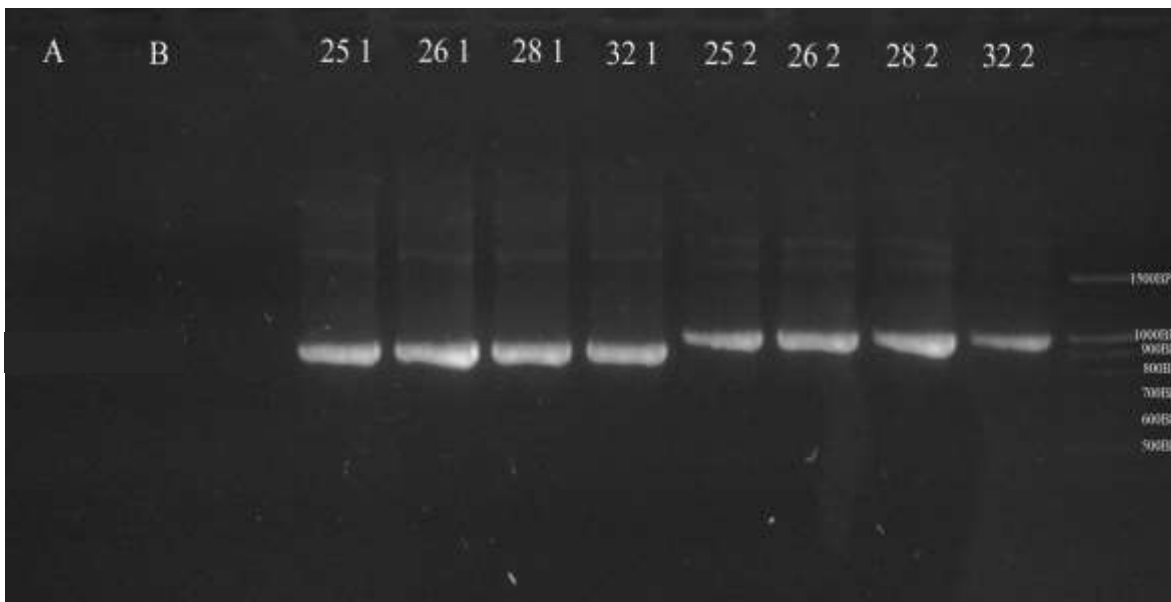
Amplifikasi DNA pengkode 16S rRNA isolate bakteri hawar daun edamame akan menghasilkan urutan nucleotide 16S rRNA yang dapat digunakan untuk menentukan identitas bakteri tersebut. DNA ini mengandung urutan yang konservatif secara evolusi. Daerah yang konservatif dapat digunakan sebagai situs pelekatan primer sehingga dapat diamplifikasi secara in vitro dengan teknik PCR (Frank, 2008). Pada penelitian ini digunakan dua pasang primer universal untuk 16S rRNA. Pasangan primer pertama ialah 27F (5 AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3) dan 907R (5 CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3). Pasangan primer kedua ialah 533F (5 GTG CCA GCM GCC GOG GTA A 3) dan 1492R (5 GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3) (Lane, 1991). Penggunaan dua pasang primer tersebut, ialah untuk mendapatkan sekuen gen 16S rRNA secara utuh. Penggunaan hanya 1 pasang primer saja seringkali tidak menghasilkan hasil pembacaan yang bagus, sehingga 2 pasang primer dapat digunakan untuk menghasilkan sekuen gen yang utuh.



**Gambar 2.** Profil Genom Isolat Bakteri Hawar Daun Edamame Dari Daerah Jember Berdasarkan Box PCR

Hasil amplifikasi DNA pengkode 16S rRNA pada gambar 3 menunjukkan bahwa pita DNA hasil PCR dengan pasangan primer 27F dan 907R tampak sejajar dengan pita DNA marker yang berukuran 900 bp. Hal ini relevan dengan hasil yang diharapkan yaitu fragmen DNA berukuran 873 bp berkisar di pita DNA marker tersebut. Sedangkan pita DNA hasil

PCR dengan pasangan primer 533F dan 1492R berada pada kisaran fragmen DNA marker yang berukuran 1000 bp. Hasil ini sesuai dengan ekspresi ukuran hasil PCR menggunakan primer tersebut yaitu 959 bp. Hasil elektroforesis gel agarose 1% tersebut tampak bahwa seluruh produk PCR yang didapatkan merupakan pita tunggal. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua pasang primer dapat mengamplifikasi secara spesifik fragmen DNA yang diharapkan. pada control negatif kedua pasang primer tersebut menunjukkan hasil negatif, hal ini mengindikasikan bahwa ampikon yang dihasilkan bukan kontaminan (Gambar 3). Produk PCR sudah berhasil dipurifikasi dan dikonfirmasi panjang basa nukleotida sesuai dengan ekspektasi yaitu berukuran 837 bp dan 1000 bp.



**Gambar 3.** Hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Amplifikasi DNA pengkode 16S rRNA

### **Karakteristik Bakteri PGPR (*Bacillus* spp., *Pseudomonad fluorescens*, *ctinomycetes*)**

Berdasarkan hasil eksplorasi dari beberapa lokasi pada tanah beserta akar didaerah perakaran (rhizosfer) edamame dan gulma disekitar pertanaman edamame, *Bacillus* spp. yang berhasil diisolasi sebanyak 197 isolat yang bersifat Gram positif, pada medium TSA memperlihatkan koloni yang bulat, berlendir bertepi rata dan tidak tembus cahaya. *Pseudomonad fluorescens* yang berhasil diisolasi sebanyak 169 isolat yang bersifat Gram negatif dan menunjukkan koloni yang berpendar pada medium Kings B. Hasil isolasi Actinomycetes yang ditumbuhkan pada medium YPGA memperlihatkan koloni yang kering dan lama – kelamaan menjadi kasar. Pada awalnya koloni mempunyai permukaan yang halus,

tapi setelah ditumbuhkan kurang lebih 5 hari akan menjadi kering, padat dan kasar dan pada permukaan koloni akan tampak kusut seperti kulit keriput. Setelah kurang lebih umur 21 hari pada permukaan koloni akan tumbuh miselium. Berdasarkan isolasi dari berbagai rhizosfer tanaman telah diperoleh 104 isolat yang menunjukkan ciri – ciri isolat seperti tersebut diatas.

### **Pengujian Daya Hambat Bakteri PGPR terhadap Bakteri Hawar daun Edamame Secara *In Vitro***

Berdasarkan pengujian antibiosis terhadap bakteri hawar daun edamame dari 197 isolat *Bacillus* spp. terdapat 14 isolat yang memiliki sifat antagonis terhadap bakteri hawar daun edamame. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona penghambatan. Sedangkan untuk isolat *Pseudomonad fluorescens* dari 169 isolat, terdapat 12 isolat yang menghambat bakteri hawar daun edamame dan dari 104 isolat Actinomycetes, terdapat 18 isolat yang dapat menghambat bakteri hawar daun edamame. Zona hambatan bakteri antagonis terhadap bakteri daun edamame bervariasi antara 0,5 mm sampai dengan 40 mm. Mekanisme penghambatan bakteri PGPR terhadap bakteri hawar daun edamame bervariasi yaitu bersifat bakteristatik dan bakterisida. Isolat *Bacillus* spp. dan *Pseudomonad fluorescens* bersifat bakteristatik (bakteri hanya mampu menghambat pertumbuhan patogen) yang dapat dilihat dari air pepton 1% yang menjadi keruh setelah diberi agar dari zona hambatan, isolat Actinomycetes sebanyak 23 bersifat bakteristatik dan 4 isolat bersifat bakterisida., bakteri tersebut dapat benar – benar membunuh bakteri patogen *P. syringae* pv. *glycines*. Hal ini ditunjukkan dengan air pepton 1% yang telah diberi agar dari zona hambatan tetap bening.

### **Simpulan hasil penelitian**

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut: (1) Bakteri penyebab penyakit hawar daun edamame dari beberapa lokasi di Jember (Ajung, Sukorambi, Wirolegi, Panti dan Sumber Sari) ialah *P. syringae* pv. *glycinea* (2) Identifikasi molekuler bakteri hawar daun edamame berdasar gen pengkode 16S rRNA, pada PCR dengan primer 27f-907r dan 533f-1492r telah berhasil mengamplifikasi gen pengkode 16S rRNA pada 4 isolat (Psg 25, Psg 26, Psg 28, Psg 32), produk PCR sudah berhasil dipurifikasi dan dikonfirmasi panjang basa sesuai dengan ekspektasi (3) Berdasarkan pengujian daya hambat PGPR terhadap bakteri hawar daun edamame dari 197 isolat *Bacillus* spp. terdapat 14 isolat yang memiliki sifat antagonis terhadap bakteri hawar daun edamame, 169 isolat *Pseudomonad fluorescens* terdapat 12 isolat yang menghambat bakteri hawar daun edamame dan dari 104 isolat Actinomycetes, terdapat 18 isolat yang dapat menghambat

bakteri hawar daun edamame. Zona hambatan bakteri antagonis terhadap bakteri daun edamame bervariasi antara 0,5 mm sampai dengan 40 mm.

**Kata kunci : Bakteri hawar daun, kedelai edamame, PGPR**

### **Daftar Pustaka**

- Asrul. 2007. Deteksi patogen penyebab penyakit hawar daun bakteri dari benih kedelai. *Agroland*. 14(1): 18-23.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Cle'Ment, and E. D A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied And Environmental Microbiology* 72(9):4951-4959.
- Frank, Reich, Sharma, Weisbeum, Wilson & Olsen. 2008. Critical Evaluation of Two Primer Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental* . Vol. 74 (8): 2461-2470.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-147. In E. Stackebrand and M. Goodfellow (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systemics*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Lelliot, Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bcaterial Diases of plants*. Oxford: Blackwell Sci. Publ.
- Oda, Wanders, Lois, Wim, Jan & Larry. 2002. Genotypic and Phenotypic Diversity within Spesies of Purple Nonsulfur Bacteria Isolated from Aquatic Sediments. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68 (7): 3467-3477.
- Savas, Adiguzel, Inan, Ozkan, Gullence, & Sahin, F. 2009, Molecular Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from Van City Ercis Town Hasanabdal Hot Sring. *Journal Roumanian Biotechnological Letters*. Vol. 14(3): 4445-4454
- Schaad NW. 1988. *Laboratory Guide For Idetification of Plant Pathogenic bacteria*. 2nd Edition. Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Schaad NW, JB Jones, W Chun. 2001. *Laboratory Guide For Idetification of Plant Pathogenic bacteria*. Third Edition. Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Suryadi Y, M Machmud. 2006. Deteksi *Pseudomonas syrngae* pv. *glycenia* (Psg) menggunakan antibody poliklonal dan NCM-ELISA. *Berita Biologi* 8(1): 45-51.
- Tsai, Y. L., & B. H. Olson, 1991, Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Appl. Environ Microbial*. Vol. 57: 1070-1074