



**EKSPLORASI *Bacillus* spp. SEBAGAI AGEN ANTAGONIS TERHADAP
Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* DARI FILOSER GULMA
DI PERTANAMAN KEDELAI**

SKRIPSI

Oleh

**DIPTA LINGGAR WISMA NING AYU
NIM 151510501040**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**EKSPLORASI *Bacillus* spp. SEBAGAI AGEN ANTAGONIS TERHADAP
Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* DARI FILOSER GULMA
DI PERTANAMAN KEDELAI**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian

Oleh

**Dipta Linggar Wisma Ning Ayu
NIM 151510501040**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda tercinta Suharno dan Ibunda tersayang Lilis Susiatin, yang tak pernah lelah mendoakan dan melimpahkan kasih sayang.
2. Kakak perempuan Ian Angga Atiawati, keponakan Keysha Mahestri Pramudhana Putri yang selalu menjadi semangat dan inspirasi dalam diri penulis sehingga dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. Guru-guru dan Pembimbing dari Sekolah Dasar hingga Perguruan Tinggi yang telah memberikan ilmu serta bimbingannya selama proses belajar dengan penuh kesabaran dan dedikasi yang tinggi.
4. Semua teman-teman tercinta atas motivasi dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
5. Almamater Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember yang saya cintai dan banggakan.

MOTTO

“Don’t Waste Your Time, Or Time Will Waste You”
(Muse – Knight of Cydonia)

“We’ll Run Wild We’ll Be Glowing In The Dark”
(Coldplay – Charlie Brown)

“Jangan Bandingkan Dirimu Dengan Siapapun Di Dunia Ini Karena Jika Kamu Melakukan Hal Ini, Kamu Sesungguhnya Sedang Merendahkan Dirimu Sendiri”
(Bill Gates, Microsoft)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Dipta Linggar Wisma Ning Ayu

NIM : 151510501040

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Eksplorasi *Bacillus* spp. sebagai Agen Antagonis terhadap *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* dari Filosfer Gulma di Pertanaman Kedelai”** adalah benar-benar hasil karya penulis sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya tulis plagiasi. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

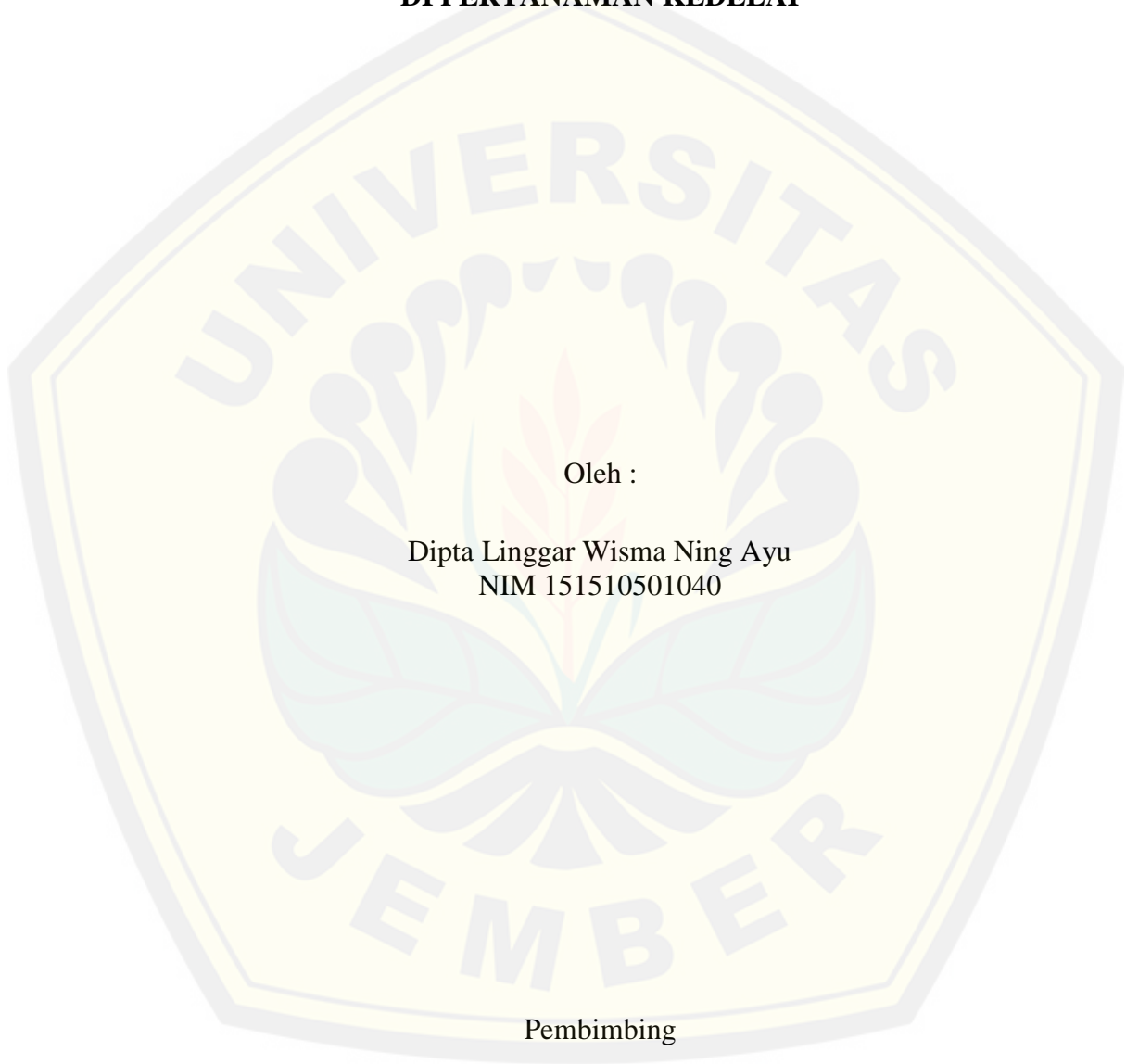
Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 November 2019
Yang menyatakan

Dipta Linggar Wisma Ning Ayu
NIM 151510501040

SKRIPSI

**EKSPLORASI *Bacillus* spp. SEBAGAI AGEN ANTAGONIS TERHADAP
Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* DARI FILOSER GULMA
DI PERTANAMAN KEDELAI**



Oleh :

Dipta Linggar Wisma Ning Ayu
NIM 151510501040

Pembimbing

Dosen Pembimbing Skripsi : Dr. Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti S.P., M. Sc.
NIP : 197303252003122002

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Eksplorasi *Bacillus* spp. sebagai Agen Antagonis terhadap *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* dari Filosfer Gulma di Pertanaman Kedelai” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Jumat

Tanggal : 29 November 2019

Tempat : Ruang Sidang I Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Skripsi,

Dr. Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti S.P., M. Sc.
NIP 197303252003122002

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC
NIP 196606301990031002

Ir. Sigit Prastowo, MP.
NIP 196508011990021001

Mengesahkan,
Dekan,

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D.
NIP 196005061987021001

RINGKASAN

Eksplorasi *Bacillus* spp. sebagai Agen Antagonis terhadap *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* dari Filosfer Gulma di Pertanaman Kedelai; Dipta Linggar Wisma Ning Ayu; 151510501040; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Kedelai merupakan penghasil sumber protein yang digunakan untuk memenuhi gizi masyarakat. Konsumsi kedelai semakin meningkat namun produksi kedelai tidak mampu untuk memenuhi kebutuhan masyarakat. Salah satu faktor yang menjadi penyebab tidak stabilnya produksi kedelai dalam budidaya tanaman kedelai yaitu adanya Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) yang dapat menyebabkan turunnya produksi kedelai salah satunya adalah penyakit pustul kedelai yang disebabkan oleh *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*). Pada varietas, *Xag* dapat menyebabkan kerugian sekitar 53,79%. Gejala yang ditimbulkan yaitu adanya bintik-bintik kecil berwarna hijau pucat yang kemudian menjadi bercak dan muncul pustul di tengah bercak di bagian bawah daun.

Pengendalian kimia merupakan cara pengendalian yang sering digunakan, namun apabila penggunaannya kurang bijaksana akan mencemari lingkungan. Pengendalian yang dapat dilakukan untuk menekan perkembangan *Xag* yaitu dengan menggunakan teknik pengendalian hayati dengan memanfaatkan agen antagonis. Agens antagonis yang diisolasi dari filosfer memiliki kemampuan untuk menekan penyebab penyakit pustul kedelai. Agens antagonis memiliki habitat pada permukaan daun sehingga termasuk mikroba filosfer. Filosfer merupakan area terjadinya interaksi antara mikroba dengan bagian tanaman yang terletak diatas permukaan tanah atau disekitar permukaan daun. Salah satu mikroba filosfer yang dapat digunakan untuk menekan perkembangan *Xag* adalah *Bacillus*. Penghambatan *Bacillus* terhadap patogen memiliki beberapa mekanisme yaitu antibiotik, kompetisi ruang dan waktu, hiperparasitisme dan induksi ketahanan. *Bacillus* spp. digunakan sebagai biokontrol karena menghasilkan bermacam jenis antibiotik *Peptide*, *subtilin*, *subtilosin*, *bacilysin* dan *surfactin*.

Bacillus dapat diisolasi dari berbagai jenis filosfer tanaman seperti filosfer daun padi, filosfer daun reundeu, filosfer daun kacang tunggak dan filosfer daun kentang. *Bacillus* spp. yang diisolasi dari filosfer tanaman jagung mampu menekan *Exerohilum turcicum* secara *in vitro*. Gulma dapat digunakan sebagai inang alternatif untuk mempertahankan siklus hidup mikroba karena adanya nutrisi yang dapat dimanfaatkan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh *Bacillus* spp. yang berasal dari filosfer gulma dipertanaman kedelai yang berpotensi sebagai agens antagonis terhadap *Xag* secara *in-vitro* dan mengetahui karakteristik *Bacillus* spp. yang berasal dari filosfer gulma dipertanaman kedelai yang berpotensi sebagai agens antagonis terhadap *Xag*. Metode penelitian yang dilakukan meliputi peremajaan dan perbanyakan isolat *Xag*, konfirmasi karakterisasi *Xag*, pengambilan sampel gulma, isolasi dan pencirian *bacillus* spp, uji gram, uji hipersensitif, *screening* bakteri, uji katalase, uji hidrolisis pati, uji pertumbuhan suhu 45°C dan 65°C, uji pertumbuhan pH 5,7, uji pertumbuhan 7% NaCl, uji pertumbuhan anaerob, uji produksi asam.

Hasil eksplorasi diperoleh sebanyak 31 isolat dari beberapa spesies gulma dan 22 isolat diantaranya mampu menghambat *Xag* secara *in-vitro* dengan zona hambat yang berbeda-beda. Sebanyak lima isolat memiliki zona hambatan sebesar $\geq 8,5$ mm yaitu isolat Jg 3(6), Bg d 1(1), Jg 1(3), Jg 1(4)1 dan Bp 2(2). Berdasarkan hasil pengujian fisiologi dan biokimia dapat dikatakan bahwa isolat Bp 2(2) memiliki karakteristik yang mirip dengan *B. coagulans* sedangkan empat isolat lain yaitu isolat Jg 3(6), Bg d 1(1), Jg 1(3), Jg 1(4)1 memiliki karakteristik yang mirip dengan *B. licheniformis*.

Isolat Bp 2(2) mampu tumbuh pada pH 5,7; suhu 45°C namun tidak mampu tumbuh pada suhu 65°C dan NaCl 7%, mampu tumbuh pada kondisi anaerob dalam glukosa broth namun tidak mampu memproduksi asam pada mannitol dan dextrose. Empat isolat lain memiliki karakteristik yang sama yaitu memiliki hasil positif dalam semua uji tetapi tidak mampu memproduksi asam pada dextrose.

SUMMARY

Exploration *Bacillus* spp. as An Antagonist Agent of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* from Filosphere Weeds in Soybean Plants; Dipta Linggar Wisma Ning Ayu; 151510501040; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Soybean is a producer of protein source which is used to fulfill people's nutrition. Soybean consumption is increasing but soybean production is unable to provide for people's needs. One of the factors that cause the unstable production of soybeans in soybean cultivation is the existence of Plant Pests (OPT) which can cause a decrease in soybean production, one of which is soybean pustules caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*). In the susceptible varieties, *Xag* can cause losses of around 53.79%. Symptoms that arise are small pale green spots which then become blotches and pustules appear in the middle of the spots on the underside of the leaves.

Chemical control is a control method that is often used, but if its use is not wise it will pollute the environment. Control that can be done to suppress the development of *Xag* is to use biological control techniques by using antagonistic agents. Antagonistic agents isolated from the filosphere have the ability to suppress the causes of soybean pustules. Antagonistic agent is on the surface of the leaf so it belongs to the microbial filosphere. Filosphere is an area of interaction between microbes and plant parts that are located above the soil surface or around the surface of the leaf. One of the microbial filaments that can be used to suppress the development of *Xag* is *Bacillus*. *Bacillus* inhibition of pathogens has several mechanisms, namely antibiotics, space and time competition, hyperparasitism and induction of endurance. *Bacillus* spp. used as a biocontrol because it produces various types of antibiotics *peptide*, *subtilin*, *subtilosin*, *bacilysin* and *surfactin*.

Bacillus can be isolated from various types of plant filosphere such as the rice leaf filosphere, reundeu leaf filosphere, cowpea leaf atmosphere and potato leaf filosphere. *Bacillus* spp. isolated from the corn plant filosphere is able to

suppress *Exerohilum turcicum* in vitro. Weed is a plant that grows between the main plants. Weed can be used as an alternative host to maintain the microbial life cycle because of the presence of nutrients that can be utilized.

Exploration results obtained as many as 31 isolates from several weed species and 22 of them were able to inhibit *Xag* in vitro with different inhibitory zones. Five isolates had inhibition zones of ≥ 8.5 mm, they were Jg 3(6), Bg d 1(1), Jg 1(3), Jg 1(4)1 and Bp 2(2) isolates. Based on the results of physiological and biochemical testing, it can be said that the isolate Bp 2(2) has similar characteristics with *B. coagulans* while the other four isolates are Jg 3(6), Bg d1(1), Jg 1(3), Jg 1(4)1 has characteristics similar to *B. licheniformis*.

Isolate Bp 2(2) is able to grow at pH 5.7; temperature 45°C but unable to grow at 65°C and NaCl 7%, able to grow under anaerobic conditions in glucose broth but unable to produce acid in mannitol and dextrose. Four other isolates had the same characteristics, which were positive results in all tests but were unable to produce acid on dextrose.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Eksplorasi *Bacillus* spp. sebagai Agen Antagonis terhadap *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* dari Filosfer Gulma di Pertanaman Kedelai”** Tidak lupa sholawat dan salam tetap tucurahkan kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari masukan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu ucapan terima kasih saya sampaikan kepada

1. Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala pertolongan dan petunjuk yang diberikan sehingga penulis mampu menyelesaikan semua ini.
2. Bapak Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
3. Bapak Ir. Hari Purnomo, M.Si.,Ph.D.,DIC. selaku Ketua Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember sekaligus Dosen Penguji I yang telah memberikan kritik dan saran penulis untuk menyempurnakan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Ir. Sigit Prastowo, MP. selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Dosen Penguji II yang telah membimbing dan memberikan kritik dan saran kepada penulis.
5. Ibu Dr. Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti, S.P.,M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Skripsi (DPS) untuk waktu, arahan, bimbingan, motivasi dan kesabaran selama penulis menyusun skripsi ini.
6. Ayahanda tercinta Suharno dan Bunda tersayang Lilis Susiatin, Saudara Perempuan Ian Angga Atiawati, Keponakan Keysha Mahestri Pramudhana Putri yang telah memberikan doa, dukungan, kasih sayang serta semangat secara moral dan materi mulai dari awal hingga terselesaikannya skripsi ini.
7. Sahabat terbaik Aditya Novalino Sandyartha.
8. Teman satu tim proyek Siti Rahayu yang telah sabar, tabah, pengertian menghadapi penulis.

9. Sahabat-sahabat Putriana Ayu, M. Faisal Aminudin, Guntur Achriwinata dan U'thiya Nurul yang telah membantu, memotivasi, dan menjadi tempat berkeluh kesah saya untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman-teman DT-41B yang telah memberikan dukungan penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
11. Keluarga besar Agroteknologi angkatan 2015 atas kenangan, kebersamaan, suka duka selama masa perkuliahan.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat, dukungan dan bantuan.

Semoga karya ilmiah tertulis ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan penulis juga menyadari bahwa karya ilmiah tertulis ini masih jauh dari sempurna sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan selanjutnya.

Jember, 29 November 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Penyakit Pustul Kedelai <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	5
2.2 Komunitas Mikroba di Filosfer Gulma.....	6
2.3 Potensi <i>Bacillus</i> spp. Sebagai Agens Antagonis	8
2.4 Hipotesis.....	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	11
3.2 Alat dan Bahan.....	11
3.2.1 Alat.....	11
3.2.2 Bahan	11

3.3 Persiapan Penelitian	11
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	12
3.4 Variabel Pengamatan	13
3.4.1 Pengamatan Morfologi	13
3.4.2 Uji Daya Hambat <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>Xag</i>	13
3.4.3 Karakteristik Fisiologi	13
a. Uji Gram	13
b. Uji Hipersensitif	13
c. <i>Screening</i> Bakteri	14
d. Uji Katalase	14
e. Uji Hidrolisis Pati	15
f. Uji Pertumbuhan Suhu 45° dan 65° C.....	15
g. Uji Pertumbuhan pH 5,7	15
h. Uji Pertumbuhan 7% NaCl.....	15
i. Uji Pertumbuhan Anaerob dalam Glukosa Broth.....	16
j. Uji Produksi Asam.....	16
3.5 Analisis Data.....	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Hasil.....	17
4.1.1 Karakteristik <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	17
4.1.2 Pengambilan sampel di lapangan, isolasi dan Seleksi Bakteri Calon Agens Antagonis	18
4.1.3 Karakteristik <i>Bacillus</i> Asal Filosfer Gulma.....	20
4.1.4 Daya Antagonisme <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	22
4.1.5 Karakteristik bakteri	25
4.2 Pembahasan.....	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34

LAMPIRAN.....	40
DOKUMENTASI.....	43



DAFTAR GAMBAR

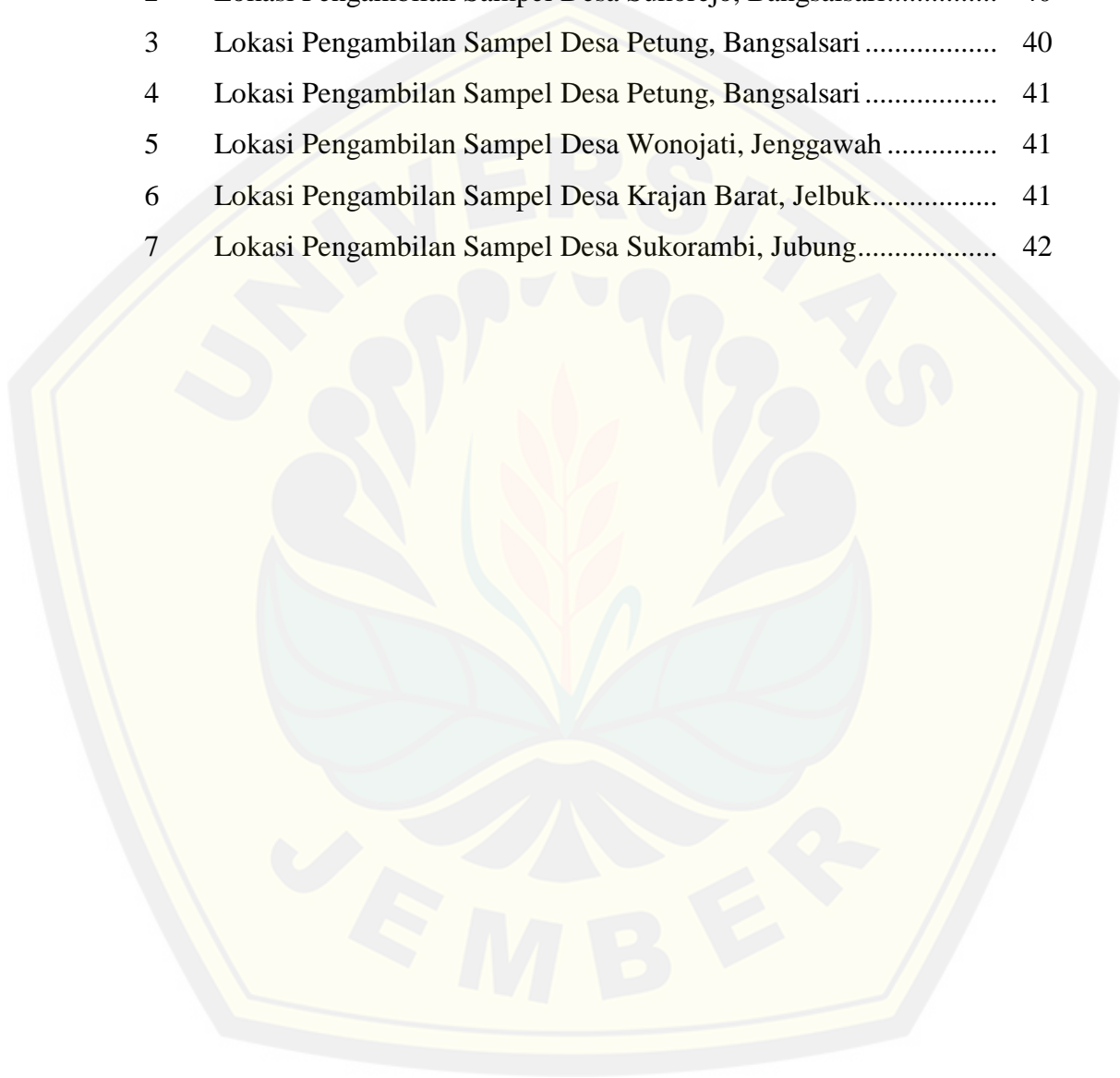
Gambar	Judul	Halaman
2.1	Gejala penyakit pustul kedelai.....	05
2.2	Koloni <i>Xag</i>	06
2.2	Koloni <i>Bacillus</i>	09
4.1	Koloni bakteri penyebab pustul kedelai	17
4.2	Hasil Pengujian gram, pati, hipersensitif, dan virulensi <i>Xag</i>	17
4.3	Hasil Pengujian gram dan hipersensitif <i>Bacillus</i>	20
4.4	Zona hambat isolat <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>Xag</i>	22
4.6	Identifikasi bakteri secara fisiologi dan biokimia.....	27
4.7	Kemampuan <i>Bacillus</i> dalam menghidrolisis pati	28
4.8	Hasil pengujian katalase	28

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
4.1	Hasil Isolasi Sampel Gulma.....	18
4.2	Morfologi Koloni	21
4.3	Zona Hambat <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>Xag</i>	22
4.4	Kriteria zona hambat <i>Bacillus</i> terhadap <i>Xag</i>	23
4.5	Karakteristik Lima <i>Bacillus</i> Terpilih	24
4.6	Idenifikasi <i>Bacillus</i> spp.....	25
4.7	Lima Spesies <i>Bacillus</i> Terpilih	26
4.8	Kemampuan Hidup Lima Isolat <i>Bacillus</i> pada Kondisi Lingkungan dan suhu yang berbeda	26
4.9	Identifikasi Lanjutan Lima Isolat <i>Bacillus</i>	27

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Judul	Halaman
1	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Sukorejo, Bangsalsari.....	40
2	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Sukorejo, Bangsalsari.....	40
3	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Petung, Bangsalsari	40
4	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Petung, Bangsalsari	41
5	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Wonojati, Jenggawah	41
6	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Krajan Barat, Jelbuk.....	41
7	Lokasi Pengambilan Sampel Desa Sukorambi, Jubung.....	42



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kedelai merupakan tanaman pangan penting setelah tanaman padi dan jagung. Konsumsi kedelai semakin meningkat karena kedelai merupakan penghasil sumber protein yang dapat digunakan untuk memenuhi gizi masyarakat (Rudini dan Ayustaningwarno, 2013). Konsumsi kedelai nasional tahun 1961-2012 menunjukkan peningkatan rata-rata sebesar 1,2 jutaan ton pertahun atau meningkat sekitar 5,37% pertahun dan hasil peramalan konsumsi rata-rata tahun 2013-2020 sebesar 2,8 jutaan ton pertahun atau meningkat sebesar 2,1% pertahun. Namun, produksi kedelai tidak dapat memenuhi kebutuhan nasional sehingga kebutuhan konsumsi tersebut dipenuhi dengan cara melakukan impor dari negara lain. Hasil peramalan produksi dan konsumsi hingga tahun 2020 menunjukkan adanya defisit dengan nilai rata-rata sebesar 1,6 jutaan ton pertahun atau menurun sekitar 0,984% (Aldilah, 2015). Beberapa faktor dapat menjadi penyebab tidak stabilnya produktivitas kedelai salah satunya disebabkan karena serangan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT). Serangan *Xanthomonas axonopodis glycines* (*Xag*) pada tanaman kedelai dengan varietas rentan dapat menyebabkan kerugian sekitar 53,79 % (Prathuangwong dan Amnuaykit, 1987). Menurut Sain dan Gaur (2013), gejala yang ditimbulkan akibat serangan *Xag* pada fase awal yaitu adanya bintik-bintik kecil berwarna hijau pucat kemudian pada fase selanjutnya titik-titik tersebut menjadi bercak dan muncul pustul di bagian tengah.

Pengendalian kimia merupakan cara pengendalian yang sering digunakan karena mudah diterapkan dan hasilnya cepat terlihat, namun apabila penggunaannya kurang bijaksana akan mencemari lingkungan (Indiati dan Marwoto, 2017). Pengendalian lain yang dapat dilakukan untuk menghambat perkembangan penyakit adalah dengan menggunakan teknik pengendalian hayati yaitu dengan memanfaatkan agens antagonis. Namun perlu dilakukan eksplorasi agens hayati yang mampu menghambat *Xag* secara *in-vitro*. Agens antagonis dapat diisolasi dari filosfer (Lindow and Brandl, 2003), rizosfer (Bustamam, 2006), rhizoplane (Cazorla *et al.*, 2007). Filosfer merupakan area terjadinya

interaksi antara mikroba dengan bagian tanaman yang terletak disekitar permukaan daun yang meliputi tulang daun, trikoma, epidermis, stomata dan kutikula (Lindow and Brandl, 2003). *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *Erwinia agglomerans*, *Curtobacterium*, *Bacillus pumilus*, *B. mycoides* merupakan jenis-jenis mikrobia bakteri yang dapat diisolasi dari dari filosfer daun (Kucheryava *et al.*, 1999).

Corynebacterium sp. dan *Bacillus* sp. sebagai agens antagonis dapat digunakan untuk mengendalikan penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai (Megasari dkk., (2017). *Bacillus* dapat membentuk endospora sehingga mampu bertahan pada keadaan lingkungan yang ekstrim dan tidak menguntungkan (Pratita dan Putra, 2012). Penghambatan *Bacillus* terhadap patogen memiliki beberapa mekanisme yaitu antibiotik, kompetisi ruang dan waktu, hiperparasitisme dan induksi ketahanan (Narayanasamy, 2013). Menurut Stein (2005), antibiotik yang dihasilkan oleh *Bacillus* yaitu *Peptide* seperti *subtilin*, *subtilosin*, *bacilysin* dan *surfactin*. *Bacillus pumilus* mampu menghasilkan senyawa *Basitrasin* (Awais *et al.*, 2007). Kim *et al.*, (2002) melaporkan bahwa *B. lentimorbus* mampu menghasilkan senyawa alpha- dan beta-glucosidase yang bersifat anti jamur sehingga mampu menghambat pertumbuhan patogen *Botrytis cinerea*. *Bacillus* spp. memiliki ciri koloni berwarna putih, membentuk spora, berbentuk bulat pada medium agar, tepi rata-tidak rata, permukaan tidak mengkilap, dan dalam waktu lama koloni bakteri akan menjadi tebal (Wardhika dkk., 2014). *Bacillus* spp. bersifat aerobik dan fakultatif anaerobik, tidak cepat memproduksi asam, membentuk endospora yang berbentuk oval, bulat dan silindris (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001). Hasil penelitian Wartono dkk., (2015) menjelaskan bahwa *B. subtilis* sebagai agens pengendali hayati mampu menekan perkembangan penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* hingga 21,7%.

Bacillus dapat diisolasi dari berbagai jenis filosfer daun. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Rizqoh dkk (2016), diperoleh beberapa bakteri filosfer reudeu yang diduga memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antimikroba dan mampu menghambat mikrobia patogen termasuk dalam strain

Klebsiella pneumoniae, *B. subtilis*, *P. Stutzeri* dan *Bacillus sp.* Hasil penelitian Satwika dkk (2017), menunjukkan bahwa *Bacillus* juga dapat ditemukan di filosfer daun kacang tunggak dan filosfer daun kentang. Aktivitas penghambatan *Bacillus* hasil isolasi dari filosfer padi mampu menghambat *Xoo* yang merupakan penyebab penyakit hawar daun padi (Nurfitriani, 2016). *Bacillus spp.* asal filosfer tanaman jagung mampu menekan *Exerohilum turcicum* secara *in vitro* (Sartoni *et al.*, 2015).

Gulma yang tumbuh diantara tanaman utama dapat digunakan sebagai inang alternatif untuk mempertahankan siklus hidup mikroba (Smith *et al.*, 2012). Gulma yang lebih banyak mendominasi di pertanaman kedelai yaitu *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Digitaria ciliaris*, *Eclipta alba* (Prayogo dkk., 2017). Oleh karena itu, diperlukan percobaan dengan melakukan eksplorasi *Bacillus* dari filosfer gulma di pertanaman kedelai sebagai agens antagonis terhadap *Xag*. Hal tersebut mengingat bahwa *Bacillus* dan *Xag* berasal dari tempat yang sama yaitu di filosfer sehingga diharapkan *Bacillus* yang diperoleh mampu menekan *Xag* jika diaplikasikan sebagai agens antagonis.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang dapat diambil dalam penelitian ini yaitu :

1. Apakah *Bacillus spp.* yang berasal dari filosfer gulma mampu berperan sebagai agens antagonis terhadap *Xag* secara *in-vitro*?
2. Bagaimanakah karakteristik *Bacillus spp.* sebagai agens antagonis asal filosfer gulma terhadap *Xag*?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Memperoleh *Bacillus spp.* yang berasal dari filosfer gulma di pertanaman kedelai sebagai agen antagonis terhadap *Xag* secara *in-vitro*.
2. Mengetahui karakteristik *Bacillus spp.* dari filosfer gulma di pertanaman kedelai yang berpotensi sebagai agens antagonis terhadap *Xag*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai :

1. *Bacillus* spp. yang diperoleh dari filosfer gulma di pertanaman kedelai mampu berperan sebagai agens antagonis terhadap *Xag*.
2. Karakteristik *Bacillus* spp. dari filosfer gulma di pertanaman kedelai yang berpotensi sebagai agens antagonis terhadap *Xag*.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Pustul Kedelai *X. axonopodis* pv. *glycines*.

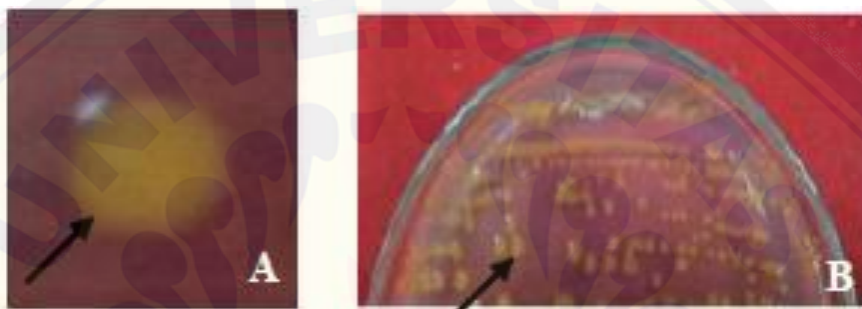
Penyakit pustul kedelai disebabkan oleh *Xag* adalah salah satu penyakit penting yang menyerang daun tanaman kedelai dan bila serangan parah dapat menyebabkan tanaman mati. Kerugian yang disebabkan oleh serangan *Xag* pada varietas rentan dapat menyebabkan kerugian mencapai 53,7 (Prathuangwong dan Amnuaykit, 1987). Bakteri *Xag* ini merupakan bakteri berbentuk batang dan mempunyai ukuran sel 0,9-1,6 μm , gram negatif, tidak membentuk spora, dapat hidup pada salinitas NaCl 2,5-5%, oksidatif positif, tidak produksi gas (Sain and Gour, 2013).



Gambar 2.1 Gejala penyakit pustul kedelai (Heitcamp *et al.*, 2014)

Gejala awal yang ditimbulkan oleh *Xag* yaitu munculnya titik-titik kecil berwarna hijau kekuningan mencapai diameter satu mm (Sain and Gaur, 2013). Titik tersebut kemudian menjadi bercak dengan tonjolan di bagian tengah seperti bisul (pustul) yang terjadi akibat hipertropi dan hiperplasia. Gejala pustul kadang-kadang tidak tampak pada bercak. Bercak berkembang menjadi besar dan berwarna coklat muda pada daun tua (Gambar 2.1). Bercak kemudian meluas membentuk daerah nekrotik pada jaringan daun yang rusak sehingga daun mudah robek oleh angin dan menyebabkan daun berlobang. Infeksi berat akan mengalami kerontokan daun dan menurunkan hasil karena berkurangnya jumlah dan ukuran biji (Semangun, 1993).

Bakteri *Xag* bersifat motil, berukuran kecil, berbentuk hampir bulat dengan tepian rata, mukoid, permukaan koloni konveks, licin, mengkilat, berwarna kuning pucat hingga kuning terang (gambar 2.2) dan dapat menghidrolisa pati (Khaeruni dkk, 2008). Koloni *Xag* tumbuh dengan optimal pada temperatur 20-40° C dan pH sekitar 5-7. Bakteri mencairkan gelatin, menghasilkan asam dari sukrosa tetapi tidak menghasilkan gas (Lambani and Jahagidar, 2017).



Gambar 2.2 Koloni *Xag* (Yanti dkk., 2013).

Penyakit pustul kedelai dapat menyebar melalui percikan hujan, angin atau daun yang bersinggungan. Bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman melalui lubang alami seperti stomata dan hadatoda kemudian berkembang di dalam ruang antar sel (Semangun, 1993). Bakteri *Xag* juga merupakan bakteri patogen terbawa benih. Persebaran ini sulit untuk dideteksi karena tidak menunjukkan gejala yang mencolok pada benih tanaman kedelai. Menurut Khaeruni dkk (2008), keparahan penyakit di lapang dipengaruhi oleh cuaca dan kondisi lingkungan disekitar pertanaman tanaman seperti kelembaban relatif (RH), tanah, temperatur dan curah hujan. Keparahannya tinggi jika sedang dalam musim hujan dan pertanaman kedelai dalam fase generatif.

2.2 Komunitas Mikrobial di Filosfer Gulma

Gulma dapat dimanfaatkan sebagai tempat berlindung, inang alternatif, sumber pakan terutama bagi *arthropoda* (Masfiah dkk., 2014). Selain musuh alami, gulma juga dapat digunakan sebagai inang alternatif bagi berbagai jenis

mikrobia (Smith *et al.*, 2012). Gulma yang lebih banyak mendominasi di pertanaman kedelai yaitu *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Digitaria ciliaris*, *Eclipta alba* (Prayogo dkk., 2017).

Hasil penelitian Rizqoh dkk (2016), diperoleh beberapa bakteri filofit yang diduga memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antimikroba dan mampu menghambat mikrobia patogen termasuk dalam strain *Klebsiella pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. Stutzeri* dan *Bacillus sp.* Aktivitas penghambatan *Bacillus* hasil isolasi dari filofit padi mampu menghambat *Xoo* yang merupakan penyebab penyakit hawar daun padi (Nurfitriani, 2016).

Komunitas mikrobia filofit merupakan suatu sistem yang dipengaruhi oleh pertumbuhan mikrobia, imigrasi, dan dikurangi dengan kematian dan emigrasi (Soesanto, 2013). Thomson *et al* (1993), menyatakan bahwa komunitas mikroba filofit sangat beragam dan mempunyai kelimpahan dan variasi yang tinggi. Menurut Zhang *et al* (2010), potensi fisiologis dan jumlah bakteri gram positif lebih tinggi dibandingkan bakteri gram negatif pada komunitas mikroba filofit. Bakteri-bakteri tersebut berada di trikoma, stomata, sepanjang tulang daun, dinding sel epidermis serta jaringan intraseluler vaskuler (Mariano and Carter, 1993). Menurut Kucheryava *et al* (1999), *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *Erwinia agglomerans*, *Curtobacterium*, *Bacillus pumilus*, *B. mycoides* merupakan jenis-jenis mikroba bakteri yang berada di filofit daun.

Nutrisi pada filofit diseluruh tanaman pada umumnya diperoleh secara endogen dan eksogen, endogen yaitu nutrisi yang dikeluarkan oleh tanaman sedangkan eksogen merupakan sumber nutrisi selain dari tanaman yaitu dari pertikel tanah, debu, ion, larutan dalam hujan, embun madu kutu, mikroba mati, kotoran serangga dan burung. Nutrisi-nutrisi tersebut adalah karbohidrat, asam-asam amino, asam-asam organik, gula alkohol, vitamin dan nutrisi nonorganik. Nutrisi memiliki peranan penting karena secara langsung dapat menjadi substrat mikrobia dan secara tidak langsung berperan sebagai sintesis antimikroba dan siderofor. Nutrisi endogen dikeluarkan dari daun karena adanya kegiatan pencucian hujan, embun dan kabut atau karena pengeksudatan aktif melalui hidatoda. Jumlah asam amino dan karbohidrat dalam eksudat daun dipengaruhi

oleh jenis inang, letak daun, permukaan daun, umur tanaman, cahaya, suhu, kesuburan, pH (Soesanto, 2013). Anggota komunitas filosfer seperti *Phyllobacterium myrsinacearum* dan *methyllobacterium phyllosphaerae* mengonsumsi metanol yang disekresikan oleh tanaman. Kedua bakteri tersebut kemudian membentuk fitohormon berupa auksin, sitokinin dan vitamin (Madhaiyan *et al.*, 2009).

Komunitas mikroba filosfer dapat bertahan hidup sesuai dengan kondisi ekosistem suatu tanaman termasuk syarat lingkungan seperti suhu, ketersediaan air, interaksi antar mikroba. Hal ini sesuai dengan pernyataan Whipps *et al* (2008), bahwa komunitas mikroba dari filosfer dipengaruhi oleh perubahan musim. Bakteri antagonis *Bacillus* dapat bertahan pada lingkungan ekstrim dengan suhu -5°C sampai 75°C dan pH 2-8 (Avsar *et al.*, 2017). Sesuai dengan pendapat Reisberg *et al* (2013), faktor lingkungan seperti radiasi sinar matahari, musim, letak geografis dan lokasi pengambilan sampel merupakan faktor penting dalam membentuk mikrobia filosfer.

2.3 Potensi *Bacillus* spp. Sebagai Agens Antagonis

Bacillus spp. merupakan genus yang banyak digunakan sebagai biopestisida (Hidayat dkk., 2018). *Bacillus* adalah salah satu bakteri yang tergolong dalam gram positif yang hidup bebas dan tersebar pada air, tanah dan berkoloni dengan tanaman yang memiliki bentuk berupa batang, bersel satu, bergerak dengan menggunakan flagella dan mempunyai hasil katalase positif, dapat bertahan pada suhu -5°C sampai 75°C namun suhu optimal *Bacillus* spp. yaitu pada suhu 25°C - 45°C , pH 2-10 (Avsar *et al.*, 2017). *Bacillus* spp. bersifat aerobik dan fakultatif anaerobik, tidak cepat memproduksi asam, membentuk endospora yang berbentuk oval, bulat dan silindris (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001).

Menurut Rudiansyah dkk., (2017), *Bacillus* bersifat anaerob fakultatif atau aerob, mampu beradaptasi terhadap suhu, pH dan salinitas. Hal tersebut sesuai dengan Pratita dan Putra (2012) pada penelitiannya bahwa, *Bacillus* merupakan bakteri termofilik karena dapat membentuk endospora sehingga mampu bertahan

pada keadaan lingkungan yang ekstrim. *Bacillus* spp. hasil isolasi memiliki ciri koloni berwarna putih, dapat membentuk spora, berbentuk bulat pada medium agar, tepi rata-tidak rata, permukaan tidak mengkilap, dan dalam waktu lama koloni bakteri akan menjadi tebal (Gambar 2.3) (Wardhika dkk., 2014).



Gambar 2.3 Koloni *Bacillus* (Diarti dkk., 2017)

Spesies *Bacillus* merupakan penghuni alami dari filosfer (Huang *et al.*, 2012). Menurut Jatnika dkk (2013), *Bacillus* spp. mampu menekan serangan penyakit bulai yang disebabkan oleh jamur *Peronosclerospora maydis* sebesar 16-37%. *Bacillus subtilis* memiliki kemampuan menghambat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dengan membentuk zona hambat sebesar 12 mm (Agustiansyah dkk., 2013). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Prihatiningsih dan Djatmiko (2016) bahwa *Bacillus subtilis* dapat menghambat *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro* dengan zona hambatan sebesar 14 mm.

Menurut Stein (2005), *Bacillus* spp. merupakan agens antagonis yang digunakan sebagai biokontrol karena menghasilkan antibiotik *Peptide* seperti *subtilin*, *subtilosin*, *bacilysin* dan *surfactin*. Antibiotik *peptide* dapat digunakan untuk mengendalikan penyakit pada akar dan daun (Monteiro *et al.*, 2005). *Bacillus pumilus* mampu menghasilkan senyawa *Basitrasin* (Awais *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* menghasilkan lipopeptida *iturin A*, senyawa heptapeptida yang memiliki aktivitas antijamur yang cukup efektif. Senyawa *iturin* lainnya adalah *iturin C*, *bacillomycin D*, *F* dan *mycosubtilin* (Hidayat dkk., 2018).

Bacillus merupakan agens pendukung pertumbuhan tanaman atau *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB) yang dapat memodulasi tingkat hormon tanaman atau secara tidak langsung dengan mengurangi tingkat virulensi berbagai

jenis patogen yaitu dengan bertindak sebagai agens biokontrol. *Bacillus* dapat menghasilkan hormon IAA dapat berperan dalam pertumbuhan akar lateral sehingga dapat mengoptimalkan penyerapan unsur hara (Hutabarat dkk., 2014). Selain memiliki kemampuan mensintesis hormon IAA, *Bacillus* juga dapat memproduksi asam giberelin, dan sitokinin (Egamberdieva, 2016).

2.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah

1. *Bacillus* spp. hasil isolasi dari filosfer gulma di pertanaman kedelai berpotensi sebagai agens antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan *Xag* secara *in vitro*.
2. *Bacillus* spp. yang diisolasi dari filosfer gulma di pertanaman kedelai memiliki karakteristik yang sama dengan yang dideskripsikan oleh Chun & Vidaver dalam Schaad *et al* (2001).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dimulai pada bulan Desember 2018 - selesai bertempat di Laboratorium Penyakit Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu cawan petri, *object glass*, kertas label, jarum ose, tabung reaksi, gelas ukur 50 ml, alat suntik 1 cc, *scalpel*, mikro pipet, tips biru 1ml, *shaker*, *L glass*, *Elenmeyer*, *vortex*, *effendorf*, pipet tetes, mikropipet, pinset, timbangan analitik, oven, pH meter, penggaris.

3.2.2 Bahan

Bahan yang gunakan yaitu isolat *Xag* koleksi Dr. Suhartiningih Dwi Nurcahyanti,S.P., M.Sc dosen Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Isolat *Bacillus* spp. yang diambil dari filosfer gulma di pertanaman kedelai, KOH 3%, H₂O₂, media YPGA (*Yeast Peptone Glukose Agar*), media WA (*water agar*), media pati, media hugh dan leifson's OF, mannitol, dextrose, NaCl, klorofom, air steril, gliserol, parafin, NaOH, HCl, iodine, tanaman tembakau,.

3.3 Persiapan Penelitian

1. Lokasi Pengambilan Sampel Bakteri Filosfer dari Gulma

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di beberapa wilayah di Kabupaten Jember pada beberapa lahan kedelai yang terdapat gulma. Lokasi pengambilan sampel ditentukan oleh keadaan geografi yang berbeda. Pengambilan sampel gulma di setiap lokasi ditentukan satu petak pertanaman kedelai kurang lebih 0,5 ha kemudian dilakukan secara diagonal dalam satu lahan dengan luasan 1×1 m.. Lokasi pengambilan sampel berada di Desa Sukorejo Kecamatan Bangsalsari,

Desa Petung Kecamatan Bangsalsari, Desa Cangkring Kecamatan Jenggawah, Desa Wonojati Kecamatan Jenggawah, Desa Krajan Barat Kecamatan Jelbuk, Desa Jubung Kecamatan Sukorambi.

2. Peremajaan dan Perbanyakkan Isolat *X. axonopodis* pv. *glycines*.

Isolat patogen bakteri *Xag* yang diperoleh dari koleksi Dr. Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti, S.P., M.Sc dan diremajakan pada media YPGA. Isolat *Xag* diambil sebanyak satu ose kemudia dicampurkan dengan 5 ml air steril dan divortex hingga homogen. Satu ose bakteri dari suspensi tersebut digoreskan pada media YPGA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam.

3. Konfirmasi karakterisasi *X. axonopodis* pv. *glycines*.

Konfirmasi karakterisasi *Xag* dilakukan dengan melakukan uji gram, uji hipersensitifitas, uji pati dan uji virulensi. Hal tersebut dilakukan untuk memastikan bahwa isolat tersebut adalah benar isolat *Xag*.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Isolasi dan Pencirian Bakteri dari Filosfer Gulma di Pertanaman Kedelai.

Metode isolasi ini merujuk pada Nurfitriani dkk (2016). Bakteri diisolasi dari filosfer gulma di pertanaman kedelai dengan mengambil sampel daun pada bagian atas, tengah, bawah, sebanyak 1 gr dengan menggunakan timbangan analitik kemudian setiap helai daun tersebut dipotong sebesar 1x1 cm. Daun yang telah dipotong dimasukkan dalam elenmeyer yang telah berisi air steril 20 ml kemudian shaker selama 30 menit agar mikroba terlepas dari permukaan daun. Suspensi bakteri diambil 1ml dengan menggunakan mikropipet tips biru dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 9ml air steril. Suspensi dipanaskan dengan suhu 80°C selama 60 menit kemudian suspensi diencerkan hingga 10^5 . Isolasi dilakukan dengan cara mengambil suspensi dengan pengenceran 10^5 sebanyak 100 μ l kemudian disebarakan pada media YPGA menggunakan L *glass* kemudian diinkubasi selama 48 jam. Koloni-koloni tunggal yang tampak berbeda dipilih kemudian digoreskan pada media YPGA untuk dimurnikan. Tahap selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dan uji fisiologi biokimia.

3.5 Variabel Pengamatan

3.5.1 Pengamatan Morfologi

Morfologi bakteri hasil isolasi diamati secara makroskopis meliputi ukuran, pigmentasi, bentuk, tepi koloni, dan elevasi koloni.

3.5.2 Uji Daya Hambat *Bacillus* spp. terhadap *Xag*

Pengamatan uji antagonisme bakteri antagonis dengan bakteri patogen dilakukan dengan cara mengukur zona bening yang terbentuk disekeliling *Bacillus* menurut Nurcahyanti (2013).

3.5.3 Karakteristik Fisiologi

Karakterisasi *Bacillus* mengacu pada tabel identifikasi W. Chun & A. K. Vidaver dalam buku Schaad *et al.*, (2001) yaitu dengan berbagai pengujian sebagai berikut :

a. Uji Gram

Uji gram pada bakteri dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri yang telah diisolasi termasuk gram positif atau gram negatif. Langkah yang dilakukan pada uji gram yaitu mengambil isolat sebanyak 1 jarum ose dan diletakkan pada *object glass*. Isolat ditetesi larutan KOH 3% menggunakan pipet tetes dan dicampur hingga merata kemudian jarum diangkat secara perlahan. Apabila membentuk lendir maka bakteri tersebut merupakan gram negatif, jika tidak membentuk lendir maka termasuk gram positif (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001).

b. Uji Hipersensitif

Uji hipersensitif dilakukan dengan tujuan mengetahui apakah bakteri yang telah diisolasi merupakan bakteri patogenik atau nonpatogenik. Pengujian reaksi hipersensitif dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri dari isolat yang telah diinkubasi selama 48 jam. Hasil dari pengenceran tersebut diinfiltrasikan pada permukaan bawah daun tembakau menggunakan jarum suntik 1cc. Inkubasi selama 7 hari. Reaksi positif patogenik terlihat jika pada bagian yang diinfiltrasi suspensi bakteri terjadi nekrosis (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001).

c. *Screening* Bakteri

Screening bakteri dilakukan untuk mendapatkan *Bacillus spp.* yang mampu menghambat *Xag* secara *in vitro* dengan metode dual plating. Metode ini merujuk pada Nurcahyanti dkk (2013). Isolat bakteri ditumbuhkan pada media YPGA dalam satu cawan petri berisi delapan koloni dan diinkubasikan selama 48 jam pada suhu ruangan. Cawan petri dibalik pada bagian tutup ditetesi larutan klorofom sebanyak 1 mL kemudian didiamkan selama 2 jam dengan suhu ruang. Posisi cawan petri dikembalikan seperti semula lalu permukaan media diberi suspensi *Xag* 200 μ L menggunakan mikropipet pada 4 ml medium agar air 0,6% yang telah digojok hingga homogen kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°. Pengamatan dilakukan dengan melakukan pengukuran zona hambat pada 4 sisi dari tepi isolat menggunakan penggaris. Berdasarkan hasil hitung zona hambat isolat yang telah diuji kemudian dibuat score dan isolat yang mempunyai daya hambat besar diuji kembali dengan metode yang sama kemudian dilakukan karakterisasi berdasarkan Chun & Vidaver dalam Schaad *et al* (2001).

Metode selanjutnya dilakukan untuk mendeteksi mekanisme penghambatan bakteri. Agar yang berada pada zona hambatan diambil secara aseptis dengan menggunakan *scalpel* steril lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 0,5% air pepton. Apabila air pepton berubah menjadi keruh maka *Bacillus* mempunyai sifat bakteriostatik. Air pepton yang tidak berubah menjadi keruh selama lima hari maka mekanisme penghambatan bersifat bakterisidal.

d. Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui aktivitas katalase bakteri yang akan diuji. Biakan bakteri umur 48 jam diletakkan pada objek *glass* dengan jarum ose, kemudian ditetesi H₂O₂ dan dicampur secara perlahan. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001).

e. Uji Hidrolisis Pati

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisa pati atau amilum. Media yang digunakan adalah media pati yang terdiri dari Starch soluble dan NA. Uji hidrolisis pati dilakukan dengan mengambil isolat bakteri yang telah berumur 48 jam ditumbuhkan pada medium pati, kemudian diinkubasikan selama 2 hari. Setelah dua hari, medium ditetesi dengan iodine sebagai reagen pati. Reaksi positif terjadi jika disekitar koloni bakteri yang tumbuh menjadi bening, reaksi negatif jika di sekitar koloni bakteri menjadi gelap/ berwarna biru tua (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001).

f. Uji Pertumbuhan Suhu 45° C dan 65° C

Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri sebanyak 75µl menggunakan mikropipet pada media pepton cair 1% kemudian diinkubasi pada oven yang telah diatur dengan suhu 45°C dan 65°C . Kekeruhan diamati selama 5 hari masa inkubasi. Reaksi positif apabila media berubah menjadi keruh (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001). Dilanjutkan dengan ditumbuhkan pada media YPGA untuk mengetahui bakteri tumbuh atau tidak.

g. Uji Pertumbuhan pH 5,7

Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri sebanyak 75µl pada media pepton cair 1% yang telah ditetapkan pada pH 5,7 dengan pH meter. Kekeruhan diamati selama 5 hari masa inkubasi. Reaksi positif apabila media berubah menjadi keruh (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001). Dilanjutkan dengan ditumbuhkan pada media YPGA untuk mengetahui bakteri tumbuh atau tidak.

h. Uji Pertumbuhan 7% NaCl

Uji pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri sebanyak 75µl pada media pepton cair 1% yang telah dicampur dengan 7% NaCl. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan selama 14 hari. Jika pertumbuhan tidak terjadi pada konsentrasi NaCl 7%, maka pertumbuhan bakteri dapat ditentukan dengan mengulang pengujian dengan jarak konsentrasi NaCl dari 1% hingga 6% (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001). Dilanjutkan dengan ditumbuhkan pada media YPGA untuk mengetahui bakteri tumbuh atau tidak.

i. Uji Pertumbuhan Anaerob dalam Glukosa Broth

Uji ini dilakukan untuk mengetahui bakteri membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya atau tidak. Uji pertumbuhan ini dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri sebanyak satu jarum ose pada media hugh dan leifson's OF glukosa broth yang diletakkan pada tabung secara anaerob. Kondisi anaerob dibentuk dengan cara mengisi minyak mineral steril hingga kedalaman 1 cm dan inkubasi pada suhu 24°C (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001). Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Pengamatan dilakukan dengan mengamati perubahan warna pada media dari biru kehijauan menjadi kuning. Apabila media berubah menjadi warna kuning maka bakteri mampu tumbuh pada kondisi anaerob.

j. Uji Produksi Asam

Uji produksi asam dilakukan dengan menggunakan sumber glukosa yang berbeda yaitu dextrosa dan mannitol dengan tujuan mengetahui apakah bakteri tersebut dapat memproduksi asam dari kedua jenis karbohidrat tersebut atau tidak. Uji dilakukan dengan cara mempersiapkan masing-masing dua tabung reaksi yang bersisi media hugh dan leifson's OF yang mengandung karbohidrat yang sesuai kemudian memasukkan isolat bakteri pada tabung. Uji dilakukan pada kondisi anaerob, yang dapat dilakukan dengan mengisi tabung dengan minyak mineral steril hingga kedalaman 1 cm kemudian inkubasi pada suhu 28°C - 30°C dan mengamati perubahan yang terjadi setiap hari selama 14 hari. Reaksi asam yang terbentuk ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi kuning (Chun & Vidaver dalam Schaad *et al.*, 2001).

3.6 Analisa Data

Analisa data yang digunakan adalah dengan analisa deskriptif untuk menggambarkan karakteristik *Bacillus* spp. yang diisolasi dari filosfer gulma di pertanaman kedelai.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut

1. Hasil eksplorasi bakteri filosfer gulma di pertanaman kedelai di Kabupaten Jember didapatkan 22 isolat *Bacillus* yang mampu menghambat pertumbuhan patogen *Xag* secara *in-vitro*. Lima strain yang memiliki daya hambat terbesar adalah Bp 2(2) sebesar 15 mm, Jg 3(6) sebesar 11 mm, Bg d 1(1) sebesar 10 mm, Jg 1(3) yaitu 9,5 mm, Jg 1(4)1 yaitu 8.5 mm.
2. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa *Bacillus* strain Jg 3(6), Bg d 1(1), Jg 1(3), Jg 1(4)1 memiliki karakteristik yang mirip dengan *B. licheniformis* dan strain Bp 2(2) memiliki karakteristik yang mirip dengan *B. coagulans*.

5.2 Saran

Bacillus diketahui memiliki banyak kemiripan karakteristik dalam setiap spesies, oleh sebab itu disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk memastikan karakteristik *Bacillus* yang akan diteliti dengan melakukan pengujian lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiansyah., S. Ilyas., Sudarsono., dan M. Machmud. 2013. Karakterisasi Rizobakteri yang Berpotensi Mengendalikan Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* dan Meningkatkan Pertumbuhan Tanaman Padi. *HPT Tropika*, 13 (1): 42-51.
- Aldilah, R. 2015. Proyeksi Produksi dan Konsumsi Kedelai Indonesia. *Ekonomi kuantitatif Terapan*, 8 (1): 9-23.
- Amri, E., N. Widhyastuti., dan I. M. Artika. 2010. Aktivitas Amilase Bakteri yang Diisolasi dari Sumber Air Panas Ciseeng Bogor. *Saintek*, 2(1): 23-33.
- Arwiyanto, T. 1997. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Penyakit Tembakau: 1.Isolasi Bakteri Antagonis. *Perlindungan Tanaman Indonesia*, 3 (1): 54-60.
- Avsar, C., H. Koyuncu., and E. S. Aras. 2017. Isolation and Molecular Characterization of *Bacillus* spp. Isolated From Soil for Production of Industrial Enzymes. *Biological and Chemical Research*, 1 (1): 72-86.
- Awais, M., A.A. Shah., A. Hamed., and F. Hasan. 2007. Isolation, Identification and Optimazation of Bacitracin Produced by *Bacillus* sp. *Pak J. Bot*, 39(4):1303-1312.
- Bustamam, H. 2006. Seleksi Mikroba Rizosfer Antagonis terhadap Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Jahe di Lahan Tertundus. *Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia*, 8 (1): 12-18.
- Cappucino, J.G., N. Sherman. 1992. *Microbiology a Laboratory Manual 3rd Edition*. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Redwood City, California.
- Cazorla, F.M., D.Romero., A.P. Garzia., B.J.J. Lugtenberg., A. de Vicente., and G. Bloemberg. 2007. Isolation and Characterization of Antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the Avocado Rhizoplane Displaying Biocontrol Activity. *Applied Microbiology*, 103 (1): 1950-1959.
- Chatri, M. 2016. Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan Edisi Pertama. Jakarta : KENCANA.
- Diarti, M.W., Rohmi., Y.S.K.Acmad., dan Y. Jiwintarum. 2017. Karakteristik Morfologi, Koloni dan Biokimia Bakteri yang Diisolasi dari Sedimen Laguna Perindukan Nyamuk. *Kesehatan Prima*, 11 (2): 124-136.

- Egamberdieva, D. 2008. *Bacillus* spp.: A Potential Plant Growth Stimulator and Biocontrol Agent Under Hostile Environmental Conditions. London: Springer.
- Estuningsih, S.P., Muharni., dan M. Rynanda. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Hidrokarbon di Sekitar Rizosfer Rumput Belulang (*Eleusine indica* L. Gaertn) yang Berperan dalam Fitoremediasi Limbah Minyak Bumi, *Penelitian Sains*, 15 (1): 40-43.
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* sp. *Oseana*, 25(1): 31-41.
- Heitkamp, E.C., R.S. Lamppa., P.A. Lambrecht., R.M. Harveson., F.M. Mathew., S.G. Markell. 2014. First Report of Bacterial Pustule on Soybean in North Dakota. *Plant Health Brief*, 15 (4): 155-156.
- Hidayat, W. A., P. Ardiningsih., dan A. Jayuska. 2018. Aktifitas Antioksidan dan Antibakteri Fraksi Etil Asetat Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume) Terenkapsulasi Gelatin. *Kimia Khatulistiwa*, 7(2): 33-40.
- Huang, T.P., D.D.S. Tzeng., A.C.L. Wong., C.H. Chen., K.M. Lu., Y.H. Lee., W.D. Huang., B.F. Hwang., and K.C.Tzeng. 2012. DNA Polymorphisms and Biocontrol of *Bacillus* Antagonistic to Citrus Bacterial Canker with Indication of The Interference of Phyllosphere Biofilms. *PlosONE*, 7 (7) : 1-12.
- Hutabarat, R., F. Puspita., dan M. A Khoiri. 2014. Uji Formulasi Pupuk Organik Cair Berbahan Aktif *Bacillus* sp. pada Pembibitan Utama Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq). *Jom Faperta*, 1 (2) : 1-13.
- Indiati, S. W., dan Marwoto. 2017. Penerapan Pengendalian Hama Terpadu (PHT) pada Tanaman Kedelai. *Buletin Palawija*, 15(2): 87-100.
- Jatnika, W., A.L. Abadi., dan L.Q. Aini. 2013. Pengaruh Aplikasi *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. terhadap Perkembangan Penyakit Bulai yang Disebabkan oleh Jamur Patogen *Peronosclerospora maydis* pada Tanaman Jagung. *HPT*, 1 (4):19-29.
- Javandira, C., L. Q. Aini., dan A. L. Abadi. 2013. Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. *HPT*, 1(1): 90-98.
- Keramati, S., H. Pirdashti., M.A.Esmali., A. Abbasian., dan M. Habibi. 2008. The Critical Period of Weed Control in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in North of Iran Condition. *Biological Sciences*, 11 (3): 463-467.

- Khaeruni, A., B. Tjahjono., A. Suwanto., dan M.S. Sinaga. 2008. Virulensi Sejumlah Isolat *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Asal Edamame pada Tiga Varietas kedelai. *HPT Tropika*, 8 (1) : 39-46.
- Kim, Kyoung-ja., Y. J. Yang., and J. Kim. 2002. Production of α -Glucosidase Inhibitor by β -Glucoside Inhibitor-Producing *Bacillus lentimorbus* B-6. *Microbiol Biotechnol*, 12 (6): 895-900.
- Kucheryava, N., M. Fiss., G. Auling., R.M. Kropenstedt. 1999. Isolation and Characterization of Epiphytic Bacteria from the Phyllosphere of Apple, Antagonistic *in vitro* to *Venturia inaequalis*, the Causal Agent of Apple Scab. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(1):472-478.
- Lambani, K., and S. Jahagirdar. 2017. Morphological, Cultural, Physiological And Biochemical Characteristics Of Bacterial Pustule Of Soybean Caused By *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Pure and Applied Microbiology*, 11 (2) : 1155-1159.
- Lindow, S. E., and M.T. Brandl. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4) : 1875-1883.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali., S. W. Kwon., and T. M. Sa. 2009. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a Pink-pigmented, Facultative Methylophile from the Phyllosphere of Rice. *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1 (1) : 22-27.
- Mariano, R.L.R., and S.M. McCarter. 1993. Epiphytic Survival of *Pseudomonas viridiflava* on Tomato and Selected Weed Species. *Microbial ecology*, 1(1): 47-58.
- Masfiah, E., S. Karindah., R. D. Puspitarini. 2014. Asosiasi Serangga Predator dan Parasitoid dengan Beberapa Jenis Tumbuhan Liar di Ekosistem Sawah. *HPT*, 2 (2) : 9-14.
- Megasari, A., A. L. Abadi., dan L. Q. Aini. 2017. Potensi *Corynebacterium* sp. dan *Bacillus* sp. untuk mengendalikan penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai. *HPT*, 5(1): 23-29.
- Monteiro, L., R. Mariono., and A. Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Biology and Technology*, 48 (1) : 23-29.
- Narayasamy, P. 2013. *Biological Management of Diseases of Crops*. London: Springer.

- Nurchayanti, S. D., T. Ariwiyanto., D. Indradewa., dan J. Widada. 2013. Isolasi dan Seleksi *Pseudomonas fluorescens* pada Risosfer Penyambungan Tomat. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1 (1) : 15-18.
- Nurfitriani, R., N.P.R.A. Krishanti., A. Akghdiya., dan A.T. Wahyudi. 2016. Penapisan Bakteri Filosfer Penghasil Senyawa Bioaktif Anti *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Penyebab Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Padi. *Sumberdaya Hayati*, 2 (1):19-24.
- Pracaya. 2008. *Hama dan Penyakit Tanaman*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Prathuangwong, S. And K. Amnuaykit. 1987. Studies on Tolerance and Rate-reducing Bacterial Pustule of Soybean Cultivars/Lines. *Kasetsart*, 21 (4):408-426.
- Pratita, M.Y.E., dan S.R. Putra. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas di Songgoriti setelah Dua Hari Inkubasi. *Teknik Pomits*, 1 (1): 1-5.
- Prayogo, D. P., H. T. Sebayang., dan A. Nugroho. 2017. Pengaruh Pengendalian Gulma pada Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) pada Berbagai Sistem Olah Tanah. *Produksi Tanaman*, 5 (1) : 24-32.
- Prihatiningsih, N., dan H. A. Djatmiko. 2016. Enzim amilase sebagai komponen Antagonis *Bacillus subtilis* B315 terhadap *Ralstonia solanacearum* Kentang. *HPT Tropika*, 16 (1):10-16.
- Rizqoh, D., N. R. Sari., R. N. Wati., F. Santosa., dan R. Hasanah. 2016. Aktivitas Bakteri Filosfer Daun Reundeu (*Staurogyne longata*) sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba Potensial. *Analisis Laboratorium Medik*, 1(1): 1-7.
- Rudiansyah, D., Rahmawati., dan Rafdiana. 2017. Eksplorasi Bakteri Selulolitik dari Tanah Hutan Mangrove Peniti, Kecamatan Segedong, Kabupaten Mempawah. *Protobiont*, 6 (3): 255-262.
- Rudini, B., dan F. Ayustaningwarno. 2013. Kadar Protein, Serat, Triptofan, dan Mutu Organoleptik Kudapan Ekstrusi Jagung dengan Substitusi Kedelai. *Nutrition Collage*, 2 (3): 373-381.
- Sain, S. K., and H. N. Gaur. 2013. Pathological and Physio-biochemical Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, Incitent of *Glycine maz* leaf pustules. *Indian Phytopath*, 66 (1) : 20-27.

- Sartoni, M., A. Nesci., A. Formento., and M. Etcheverry. 2015. Selection of Potential Biological Control of *Exserohilum turcium* with Epiphytic Microorganism from Maize. *Elsevier*, 47 (1): 62-71.
- Satwika, T. D., I. Rusmana., dan A. Akhdiya. 2017. Potensi *Quorum Quenching* Bakteri Filosfer dan Rizosfer terhadap *Dickeya dadanti*. *AgroBiogen*, 13 (2): 101-110.
- Schaad N. W., J. B. Jones., and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. USA; Onacid. Pg: 175-193.
- Semangun. 1993. *Penyakit-penyakit Tanaman Pangan di Indonesia*. Yogyakarta : Mulawarman University Press.
- Shivas, R., and D. Beasley. 2005. *Pengelolaan Koleksi Patogen Tanaman*. Australia.
- Smith, E. A., A. Ditommaso., M. Fuchs., A. M. Shelton., and B.A. Nault. 2012. Abundance of Weed Hosts as Potential Sources of Onion and Potato Viruses in Western New York. *Crop Protection*, 37 (1): 91-6
- Soesanto, L. 2013. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. Depok: PT RajagrafindoPersada.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* Antibiotics: structures, syntheses and specific function. *Molecular Microbiology*, 56 (4): 845-857.
- Suhartanti, M., P. R. Sarjono., dan A.L.N. Aminin. 2010. Studi Filogeni dan Uji Potensi Enzim Ekstraseluler (amilase, β -galaktosidase, protease, katalase) Isolat Alicyclobacillus sp. Gedong Songo. *Kimia Sains dan Aplikasi*, 13 (3): 13-3.
- Thomson, J.P., M.J. Bailey., J.S. Fenlon., T.R. Fermor., A.K. Lilley., J.M. Lynch., P.J. McCormack., M.P. McQuilken., K.J.Purdy., P.B.Rainey., and J.M.Whipps. 1993. Quantitative and Qualitative Seasonal Changes in the Microbial Community from the Phyllosphere of Sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil*, 150 (2):177-191.
- Wahyuni, S., Lianto., dan A. Khaeruni. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Manolitikasal Bonggol Pohon Sagu. *Agroteknos*, 4(3): 174-179.
- Wardhika, C. M., Suryanti., dan T. Joko. 2014. Eksplorasi Bakteri yang Berpotensi sebagai Agens Pengendali Hayati *Fusarium solani* dan *Meloidogyne incognita* pada Lada. *Perlindungan Tanaman Indonesia*, 18 (2) : 89- 94.

- Wartono., Giyanto., dan K. H. Mutaqin. 2015. Efektivitas Formulasi Spora *Bacillus subtilis* B12 sebagai Agen Pengendali Hayati Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 34 (1):21-28.
- Whipps, J.M., P.Hand., and G.D. Bending. 2008. Phyllosphere Microbiology with Special Reference to Diversity and Plant Genoytipe. *Applied Microbiology*, 105(2008): 1744-1755.
- Yanti, Y., T. Habazar., Z. Resti., dan D. Suhalita. 2013. Penapisan Isolat Rizobakteri dari Perakaran Tanaman Kedelai yang Sehat untuk Pengendalian Penyakit Pustul Bakteri (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *HPT Tropika*, 13 (1) :24-34.
- Yanti, Y., T. Habazar., dan Z. Resti. 2017. Formulasi Padat Rhizobakteria Indigenus *Bacillus Thuringiensis* TS dan Waktu Penyimpanan untuk Mengendalikan Penyakit Pustul Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *HPT Tropika*, 17 (1) : 9-18.
- Zhang, B., Z. Bai., D. Hoefel., X. Wang., L. Zhang., and Z. Li. 2010. Microbial Diversity within the Phyllosphere of Different Vegetable Species. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1(1): 1067-1077.

LAMPIRAN**Lampiran 1. Lokasi pengambilan sampel.**

1. Desa Sukorejo, Kecamatan Bangsalsari.



2. Desa Sukorejo, Kecamatan Bangsalsari.



3. Desa Petung, Kecamatan Bangsalsari



4. Desa Petung, Kecamatan Bangsalsari



5. Desa Wonojati, Kecamatan Jenggawah.



6. Desa Krajan Barat, Kecamatan Jelbuk.



7. Desa Sukorambi, Kecamatan Jubung



DOKUMENTASI

Menimbang sampel daun gulma sebanyak 1 gr dengan timbangan analitik.



Proses menggojok sampel daun gulma.



Proses menetapkan media di pH 5,7 menggunakan pH meter.