



**EKSPLORASI BAKTERI TERMOFILIK DAN KAJIAN POTENSINYA  
SEBAGAI AGENS PENGENDALI HAYATI PADA BEBERAPA  
PATOGEN TUMBUHAN**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Guruh Surastomo  
NIM. 121510501060**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**



**EKSPLORASI BAKTERI TERMOFILIK DAN KAJIAN POTENSINYA  
SEBAGAI AGENS PENGENDALI HAYATI PADA BEBERAPA  
PATOGEN TUMBUHAN**

**SKRIPSI**

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan  
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi (S1)  
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

**Guruh Surastomo**  
**NIM. 1215010501060**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**

## PERSEMBAHAN

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak Surianto dan Ibu Sulastri, kuhaturkan terimakasih tak terhingga atas segala pengorbanan, kasih sayang, serta do'a yang selalu dipanjatkan yang mungkin tidak dapat terbalaskan dengan apapun ;
2. Adikku Dinatul Maghfiroh dan Diniatus Sholikhah, terima kasih atas bantuan dan dukungannya yang telah diberikan selama ini ;
3. Beasiswa KEMENRISTEK DIKTI yang telah membantu dalam pendanaan selama kuliah di Universitas Jember.

**MOTTO**

Tidak ada masalah yang tidak bisa diselesaikan selama ada komitmen untuk menyelesaikannya

“Hai orang-orang yang beriman, Jadikanlah sabar dan shalatmu Sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar”

(Al-Baqarah: 153)

All the impossible is possible for those who believe!

Don't lose the faith, keep praying, keep trying!

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Guruh Surastomo

NIM : 121510501060

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **“Eksplorasi Bakteri Termofilik dan Kajian Potensinya sebagai Agens Pengendali Hayati pada Beberapa Patogen Tumbuhan”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakkan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 28 Juli 2017

Yang menyatakan

Guruh Surastomo  
NIM. 121510501060

**SKRIPSI**

**EKSPLORASI BAKTERI TERMOFILIK DAN KAJIAN POTENSINYA  
SEBAGAI AGENS PENGENDALI HAYATI PADA BEBERAPA  
PATOGEN TUMBUHAN**

Oleh

**Guruh Surastomo  
NIM. 121510501060**

**Pembimbing:**

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D  
NIP. 198011092005011001

Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Rachmi Masnilah, MSi  
NIP. 196301021988022001

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Eksplorasi Bakteri Termofilik dan Kajian Potensinya sebagai Agens Pengendali Hayati pada Beberapa Patogen Tumbuhan**” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Jum’at

Tanggal : 28 Juli 2017

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Hardian Susilo Addy., SP., MP. Ph.D.  
NIP. 198011092005011001

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Ir. Rachmi Masnilah, MSi  
NIP. 196301021988022001

Dosen Penguji Utama,

Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS., Ph.D.  
NIP. 195212171980032001

Dosen Penguji Anggota,

Dr. Suhartiningsih Dwi N., SP., M.Sc.  
NIP. 197303252003122002

Mengesahkan

Dekan,

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

## RINGKASAN

**Eksplorasi Bakteri Termofilik dan Kajian Potensinya sebagai Agens Pengendali hayati pada Beberapa Patogen Tumbuhan.** Guruh Surastomo, 121510501060. Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Patogen tumbuhan merupakan mikroorganisme penyebab penyakit pada tanaman, Beberapa patogen yang sering di jumpai dan menyerang pertanian petani, beberapa patogen tersebut antara lain : *R. solanacearum*, *X. oryzae* Pv. *oryzae*, *R. solani* dan *P. palmivora*. Serangan penyakit tersebut dapat menurunkan kualitas produk sehingga perlu dilakukan upaya pengendalian. Upaya pengendalian yang dirasa efektif dan tidak mencemari lingkungan yaitu pengendalian secara hayati. Namun, Peningkatan suhu lingkungan dapat mengurangi keefektifan agens hayati dalam mengendalikan patogen sehingga perlu dilakukan eksplorasi mikroorganisme lain yang mampu beradaptasi dengan baik dengan suhu lingkungan yang ekstrem dan memiliki potensi yang cukup baik dalam mengendalikan patogen. Salah satunya yaitu bakteri termofilik, bakteri ini mampu tumbuh dan berkembang dengan baik pada suhu ekstrem.

Pengambilan sampel bakteri termofilik dilakukan di Propinsi Jawa Timur tepatnya di dataran Kawah Ijen yang terletak di perbatasan Kab. Banyuwangi dan Kab. Bondowoso. Metode pertama yaitu melakukan Isolasi bakteri dan Skrining pertumbuhan pada suhu 37°C dan Skrining daya hambat in vitro pada patogen kelompok cendawan dan bakteri. setelah itu dilakukan pengujian mekanisme penghambatan, uji pertumbuhan pada beberapa variasi suhu, ekstraksi dan deteksi senyawa ekstakseluler metabolit sekunder dan identifikasi isolat bakteri secara molekuler.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 17 isolat hasil isolasi hanya terdapat 4 isolat bakteri yang memiliki potensi menghambat patogen baik golongan cendawan dan bakteri. Masing – masing isolat memiliki mekanisme penghambatan bakteriostatik dan memiliki kemampuan tumbuh cukup baik pada variasi suhu inkubasi 28°C hingga 45°C. Hasil analisis secara molekuler dan



*Phylogenetic tree* menunjukkan dari keempat isolat tersebut terbagi menjadi 2 kelompok yang berbeda secara genetiknya, kelompok A yaitu Isolat KW-A, KI-D dan KI-H memiliki kekerabatan dengan spesies *Acinetobacter baumannii* dan kelompok B yaitu isolat KW-D yang memiliki kekerabatan dengan genus *Enterobacter sp.*



## SUMMARY

**Exploration of Thermophilic Bacteria and Study of its Potential as a Biological Control Agent on Some Plant Pathogens.** Guruh Surastomo. 121510501060. Agrotechnology Studies program; Faculty of Agriculture; University of Jember.

Plant pathogens are disease-causing microorganisms in plants. Some pathogens are often encountered and attacked farmers cultivation, such as *R. solanacearum*, *X. oryzae* Pv. *oryzae*, *R. solani* and *P. palmivora*. The attack of the disease can reduce the quality of the product, therefore, control efforts should be done. Control efforts that are deemed effective and do not pollute the environment is biological control. However, the escalation of ambient temperature may reduce the effectiveness of biological agents in controlling the pathogens, therefore, it is needed to explore other microorganisms that are well adapted to extreme environmental temperatures and have considerable potential for controlling the pathogen. One of them is thermophilic bacteria, this bacterium is able to grow and develop well at extreme temperatures.

Thermophilic bacteria sampling is done in East Java Province, especially in the plain of Kawah Ijen which is located at border of Banyuwangi regency and Bondowoso regency. The first method involves bacterial isolation and growth screening at 37°C as well as in vitro inhibitory potential screening of fungal and bacterial group pathogens. Thereafter testing of the inhibitory mechanism, growth test on some temperature variations, extraction and detection of secondary metabolite adjunctive compounds and the identification of bacterial isolates on a molecular basis.

The results showed that from 17 of the isolated isolates, only 4 isolates of bacteria that have the potential to inhibit pathogen both fungus and bacteria class. Each isolate has a bacteriostatic inhibitory mechanism and has good growth ability at variation of incubation temperature 28°C to 45°C. The results of molecular analysis and Philogenetic tree showed that the four isolates were divided into 2 genetically different groups, A group are KW-A, KI-D and KI-H

isolates which had kinship with species *Acinetobacter baumannii* and B group is KW-D isolate which had kinship with the genus *Enterobacter* sp.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat ALLAH S.W.T. yang senantiasa melimpahkan rahmat dan maghfirah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah yang berjudul “Eksplorasi Bakteri Termofilik dan Kajian Potensinya sebagai Agens Pengendali hayati pada Beberapa Patogen Tumbuhan”. Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penyusunan karya ilmiah tertulis ini, yaitu:

1. Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph. D. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
2. Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D. dan Dr. Ir. Rachmi Masnilah, MSi. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan motivasi dalam penyusunan karya tulis ini.
3. Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS., Ph.D. dan Dr. Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti, SP., M.Sc. selaku Dosen Penguji 1 dan Dosen Penguji 2 yang telah memberikan evaluasi dan masukan demi kesempurnaan karya tulis ini.
4. Ir. Tatang Pranata, Dip.Agr selaku Dosen Pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan dukungan selama proses perkuliahan.
5. Ir. Sigit Prastowo, MP. selaku Ketua Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan.
6. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC selaku ketua program studi Agroteknologi.
7. Prof. Dr. Bambang Sugiarto, M.Agr.Sc selaku Ketua CDAST yang telah membantu dan memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST;
8. Orang tua tercinta Bapak Surianto, Ibu Sulastri dan adikku Dinatul Maghfiroh dan Diniatus Sholikhah yang selalu memberikan dukungan dan doa demi kelancaran penyusunan karya tulis ini;
9. Rekan kerja, Alm. Alik Ur Rochmana, Agnes Rezkyta Herwang Dani, M.Sholehuddin, Angga Aditya, dan Bakteriofag team, Sugar Group dan keluarga besar CDAST yang selalu membantu dan memberi masukan;
10. Teman-teman seperjuangan di Program Studi Agroteknologi 2012, B12 Agrotech, IMAGRO, IMHPT dan Keluarga besar UKM-O .

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca guna penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat. Terima kasih.

Jember, 28 Juli 2017

**Penulis**

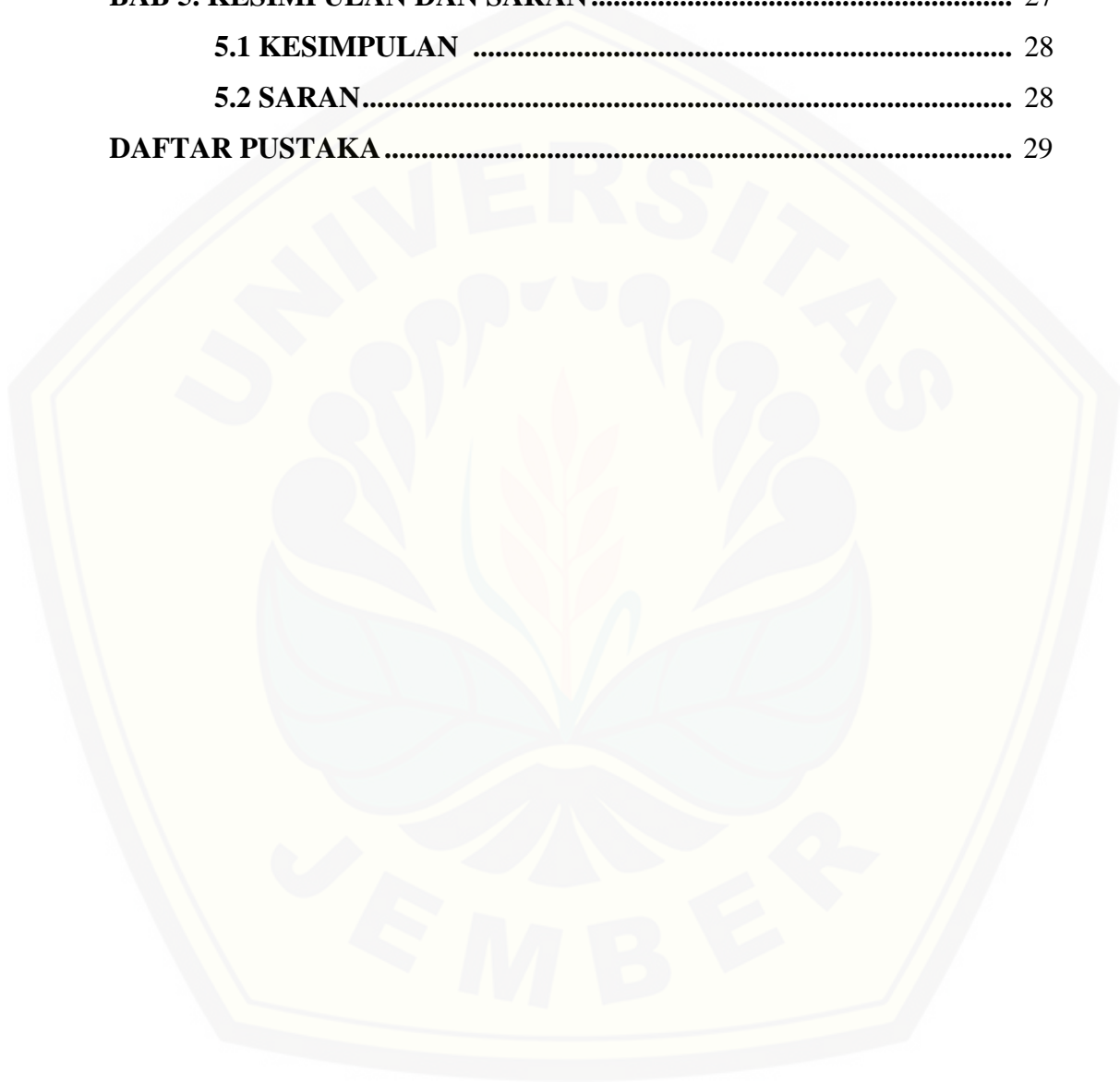


**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>x</b>
<b>PRAKATA.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Bakteri Termofilik .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Patogen tanaman.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 <i>R. solani</i> .....	5
2.1.2 <i>Phytophthora palmivora</i> .....	6
2.1.3 <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	7
2.1.4 <i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i> .....	8
<b>2.3 Tipe Mekanisme Penghambatan Bakteri .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Sekuensing 16S rRNA .....</b>	<b>8</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>	<b>10</b>

<b>3.2 Persiapan Penelitian .....</b>	<b>10</b>
3.2.1 Pengambilan Sampel.....	10
3.2.2 Isolasi Bakteri Termofilik.....	10
3.2.3 Pemurnian Bakteri Termofilik.....	10
3.2.4 Isolasi dan Cara Perbanyakkan Isolat Patogen .....	11
3.2.4.1 Isolat Patogen Hawar Pelepah Daun Padi .....	11
3.2.4.2 Isolat Patogen <i>Phytophthora palmivora</i> .....	11
3.2.4.3 Isolat Patogen <i>R. solanacearum</i> dan <i>X. oryzae</i> <i>pv. oryzae</i> .....	12
<b>3.3. Prosedur Penelitian.....</b>	<b>12</b>
3.3.1 Uji Daya Hambat <i>In vitro</i> .....	12
3.3.1.1 Uji Daya Hambat Bakteri Termofilik pada Patogen Golongan Cendawan.....	12
3.3.1.2 Uji Daya Hambat Bakteri Termofilik pada Patogen Golongan Bakteri.....	13
3.3.1.3 Uji Tipe Mekanisme Penghambatan Bakteri dan Cendawan (Bakterisidal / Fungisidal / Fungistatik atau Bakteriostatik).....	13
3.3.1.4 Uji Pertumbuhan Bakteri.....	13
3.3.1.5 Ekstraksi dan Deteksi Senyawa Antibiotik .....	14
3.3.1.6 Uji Daya Hambat Senyawa Antibiotik Terhadap Patogen Cendawan dan Bakteri .....	15
3.3.1.7 Metode Sekuensing 16S rRNA .....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Hasil .....</b>	<b>17</b>
4.1.1 Hasil Isolasi dan Skrining bakteri .....	17
4.1.1.1 Hasil Isolasi .....	17
4.1.1.2 Uji Tipe Mekanisme Penghambatan pada Bakteri (Bakterisidal / Bakteriostatik) .....	20
4.1.1.3 Uji Pertumbuhan Bakteri .....	20

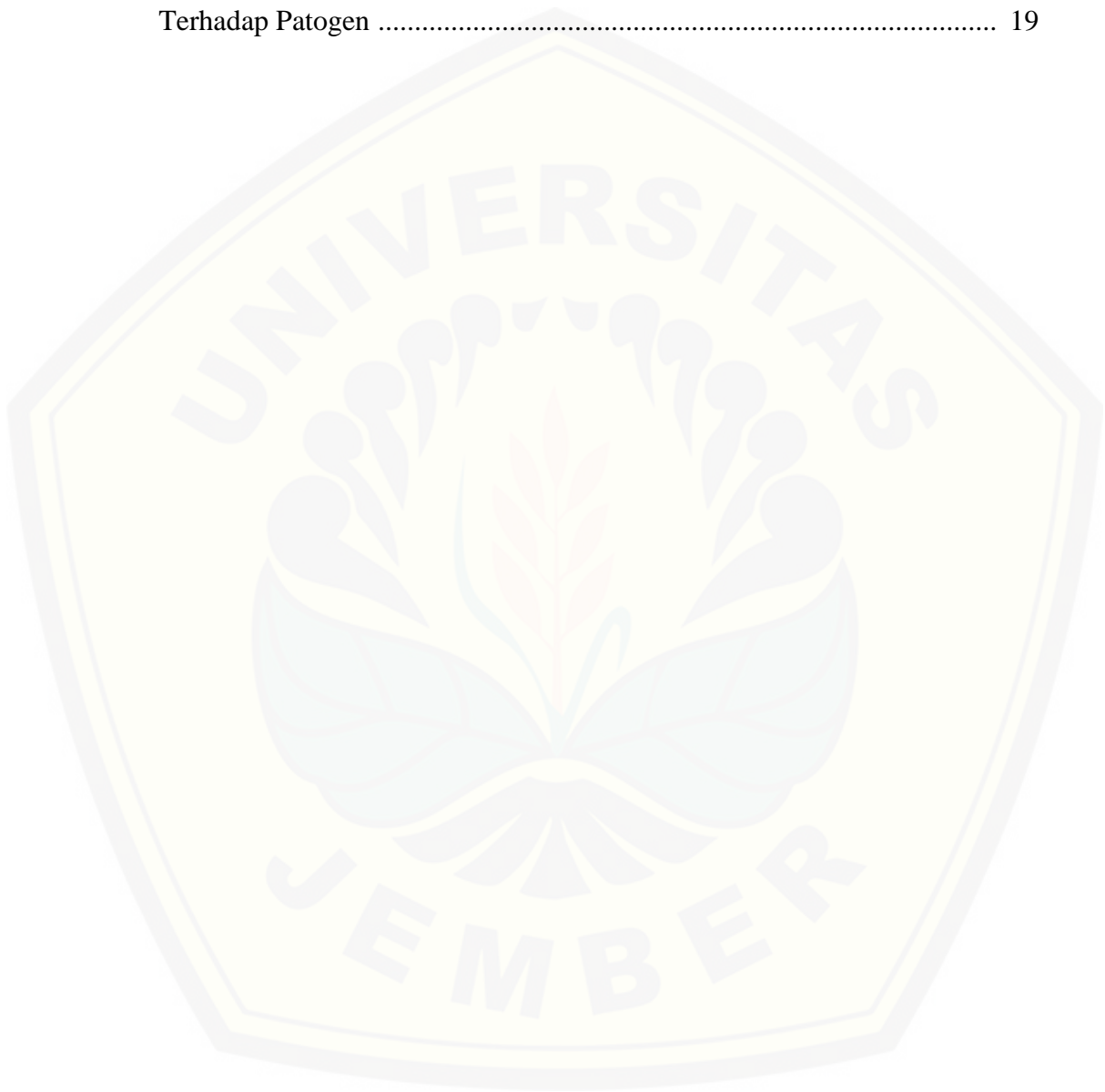
4.1.1.4 Ekstraksi dan Deteksi Senyawa Ekstraseluler	
Metabolit Sekunder .....	21
4.1.2 Identifikasi Isolat Bakteri Secara Molekuler.....	22
<b>4.2 Pembahasan.....</b>	<b>24</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 KESIMPULAN .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 SARAN.....</b>	<b>28</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>29</b>





**DAFTAR TABEL**

2.1. Sifat dan beragam spesies dari bakteri termofilik.....	5
4.1. Karakteristik Isolat dan Kemampuan Daya Hambat Terhadap Patogen .....	19



**DAFTAR GAMBAR**

3.1 Skema uji daya hambat bakteri .....	12
4.1 Peta Lokasi Pengambilan Sampel .....	17
4.2 Kultur Bakteri yang menunjukkan zona hambatan pada patogen <i>R. solani</i> (A), <i>P. palmivora</i> (B), <i>X. oryzae</i> (C) dan <i>R. solanacearum</i> (D) .....	18
4.3 Medium Pepton 1% yang dikulturkan dari agar pada zona bening pengujian daya hambat bakteri <i>R. solanacearum</i> . .....	20
4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri pada suhu 28°C (A), Suhu 37°C (B), Suhu 45°C (C) dan Suhu 80°C (D) yang Dilakukan dengan Menggunakan Spectrofotometer OD <sub>600</sub> . .....	21
4.5 Plat TLC Hasil Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder yang divisualisasi pada Sinar Ultra Violet dan Konfirmasi Senyawa Metabolit dengan Menggunakan Metode Double Layer. ....	21
4.6 Product PCR yang di visualisasikan pada agarose gel 1% dengan , M) marker (1) KW-A (2) KW-D (3) KI-D dan (4) KI- H dan divisualisasikan pada sinar Ultra violet.....	22
4.7 Pohon Filogenetik (A) Isolat KW-A,KI-D dan KI-H, (B) KW-D .....	23

**DAFTAR LAMPIRAN**

1.Hasil isolasi dan Peremajaan isolat patogen .....	33
2.Uji Hipersensitif respon .....	33



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Patogen tumbuhan merupakan mikroorganisme yang dapat menyebabkan penyakit pada tanaman. Patogen tumbuhan umumnya memperoleh nutrisi, air dan segala sesuatu dari inangnya. Keberadaan patogen pada jaringan tanaman dapat berdampak negatif terhadap pertumbuhan dan produktivitas dari tanaman tersebut, patogen dapat menyebabkan kerusakan baik kualitas maupun produk yang dihasilkan oleh tanaman sehingga dapat menurunkan nilai jual dari produk pertanian tersebut (Pscheidt, 2011).

Patogen tanaman dapat disebabkan oleh golongan cendawan dan bakteri, jika dilihat dari cara menyerangnya patogen dapat dibedakan menjadi dua, yaitu: patogen *air borne* dan patogen *soil borne*. Patogen *air borne* merupakan patogen yang menyerang tanaman melalui bagian atas tanaman seperti daun, sedangkan patogen *soil borne* merupakan patogen yang menyerang bagian perakaran tanaman. Beberapa patogen tanaman yang termasuk patogen penting yang banyak kita jumpai di lahan pertanian dan menyebabkan kerugian yang cukup tinggi antara lain : *R. solani*, *P. palmivora*, *R. solanacearum* dan *X. oryzae* pv. *oryzae* (Tjahjadi, 1989).

Upaya yang harus dilakukan untuk menanggulangi kerugian yang ditimbulkan oleh patogen tersebut yaitu upaya pencegahan dan pengendalian patogen tersebut. Salah satu cara pengendalian yang dirasa efektif, aman, tidak menimbulkan efek negatif bagi lingkungan dan tidak menimbulkan efek samping terhadap organisme bermanfaat lainnya yaitu pengendalian secara hayati (Khaeruni dan Rahman, 2013). Menurut Pal dan Gardener (2006) bahwa pengendalian hayati merupakan penggunaan mikroba antagonis untuk mengontrol dan menekan sehingga dapat mengurangi inokulum patogen.

Menurut Someya *et al.* (2005), keefektifan agens pengendali hayati antara lain dapat dipengaruhi pula oleh faktor-faktor lingkungan, baik biotik maupun abiotik. Salah satu faktor abiotik yang cukup berpengaruh terhadap keefektifan agens pengendali hayati yaitu pengaruh suhu. Suhu yang terlalu tinggi

dapat mempengaruhi tingkat keefektifan kinerja agens pengendali hayati dalam mengendalikan patogen tanaman.

Beberapa agens pengendali hayati dapat berkembang dengan baik pada suhu tertentu. Menurut Damiri *dkk.* (2014), *Trichoderma viride* dapat berkembang dan menekan pertumbuhan patogen dengan baik pada suhu 15°C - 30°C. Jaouen *et al.* (2004) *Pseudomonas fluorescens* berkembang baik pada suhu antara 15 - 32°C. Beberapa agens pengendali hayati tersebut tidak dapat berkembang dan bertahan pada suhu tinggi sehingga dapat mempengaruhi tingkat keefektifannya dalam mengendalikan patogen sehingga dibutuhkan agens hayati lainnya yang dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada suhu tinggi. Salah satu pengendalian hayati yang dapat dilakukan menggunakan bakteri termofilik. Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat hidup dan bertahan hidup di lingkungan yang ekstrem atau tidak menguntungkan. Bakteri termofilik dapat bertahan hidup di suhu 45 – 80°C sehingga berpotensi sebagai agen hayati.

Menurut Woitke (2004) Bakteri termofilik yang umum digunakan sebagai agen hayati yaitu bakteri *Bacillus subtilis*. *Bacillus ST 12e* dilaporkan dapat menghambat beberapa patogen tanaman seperti patogen *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *P. capsici* dan *R. solani* secara *in vitro*. Menurut Zeikus (1979) beberapa bakteri termofilik yang berada di alam sangat banyak dan memiliki ketahanan terhadap suhu yang tinggi, beberapa contoh bakteri tersebut, antara lain: *B. stearothermophilus*, *B. acidocaldarius*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Synechococcus lividis* dan lainnya. Sehingga pada penelitian ini melakukan isolasi dan kajian mekanisme penghambatan beberapa bakteri termofilik yang berpotensi sebagai agen pengendali hayati.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui beberapa bakteri termofilik yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen hayati serta mengetahui daya hambat dan tipe mekanisme penghambatannya terhadap patogen tumbuhan. Menurut Pankey dan Sabath (2004) Bahwa tipe mekanisme penghambatan mikroorganisme terdiri dari dua tipe yaitu bakteristatik dan bakterisidal atau fungistatik dan fungisidal. Tipe mekanisme bakteristatik atau fungistatik yaitu apabila mikroorganisme hanya memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan

patogen tetapi tidak membunuhnya. Sedangkan tipe mekanisme fungisidal dan bakterisidal yaitu apabila mikroorganisme memiliki kemampuan membunuh patogen tumbuhan.

### 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kemampuan bakteri termofilik dalam menekan pertumbuhan patogen tumbuhan dari golongan cendawan dan golongan bakteri ?
2. Bagaimanakah mekanisme penghambatan isolat bakteri termofilik tersebut?
3. Bagaimana kekerabatan bakteri termofilik yang berpotensi sebagai Agens Pengendali Hayati berdasarkan sekuensing 16S rRNA?

### 1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui beberapa bakteri termofilik yang berpotensi sebagai agen hayati pada patogen tanaman baik golongan Cendawan dan bakteri. Patogen tersebut antara lain : *R. solanacearum*, *P. palmivora*, *R. solani* dan *X. oryzae* pv. *oryzae*.
2. Untuk mengetahui kekerabatan bakteri termofilik yang berpotensi sebagai Agens Pengendali Hayati berdasarkan sekuensing DNA genom.

### 1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat mengetahui beberapa bakteri termofilik yang berpotensi sebagai agens pengendali hayati untuk mengendalikan patogen tanaman.

### 1.5 Hipotesis

1. Apakah bakteri termofilik yang diisolasi mampu menghambat patogen ?
2. Bagaimanakah kekerabatan bakteri yang telah diisolasi?

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri Termofilik

Menurut Adiguzel *et al.* (2009), Bakteri termofilik tumbuh dengan baik pada suhu antara 45°C dan 70°C sehingga bakteri ini dapat diisolasi dari beberapa lingkungan seperti habitat yang dingin, laut yang dalam, air terjun, waduk minyak bumi dan ventilasi hidrotermal di kedalaman laut. Menurut Brock (1978) bahwa Mikroorganisme termofilik memiliki kemampuan bertahan pada suhu tinggi karena adanya enzim termostabil. Selain itu, protein yang terdapat pada sel mikroorganisme termofilik memiliki ikatan hidrofobik dan ikatan ionik yang sangat kuat. Komposisi membran sel pada bakteri termofilik tersusun oleh asam lemak jenuh sehingga dapat bersifat stabil pada suhu tinggi (Lasa & Berenguer, 1993).

Menurut Baker *et al.* (2001) bahwa, Bakteri termofilik jika dilihat dari suhu pertumbuhan optimumnya maka bakteri tersebut terbagi menjadi tiga kategori yaitu sebagai berikut :

- a. *Moderate thermophiles* dengan temperatur pertumbuhan optimum berkisar antara 35-55°C
- b. *Extreme thermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum berkisar 55-85°C
- c. *Hyperthermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum berkisar 75-113°C

Bakteri termofilik yang berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia antara lain bakteri termofil sumber mata air panas di Pacet (8 genus bakteri antara lain *Thermus* sp, *Acetogenium* sp, *Bacillus* sp, *Thermodesulfobacterium* sp, *Thermomicrobium* sp, *Thermotrix* sp, *Pseudomonas* sp dan *Sulfobacillus* sp) (Asnawi dalam Pratita dan Putra, 2012).

Menurut Zeikus (1979) beberapa bakteri termofilik yang ditemukan memiliki beberapa spesies menurut sifatnya dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu aerob dan fakultatif aerobs seperti *B. stearothermophilus*, *B. acidocaldarius*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Synechococcus lividis* dan Obligat aerobs seperti seperti bakteri *Clostridium thermocellum*, *C. Thermohydrosulphuricum*, *Thermoanaerobium brockii*, *Desulphevibrio thermophiles*, *Methanobacterium*

suhu maksimum untuk pertumbuhan, lingkungan, Nutrisi dan Referensi. Salah satu bakteri termofilik yang telah umum digunakan sebagai agen hayati yaitu *Bacillus subtilis*.

Tabel 2.1. Sifat dan beragam spesies dari bakteri termofilik

Spesies	Pertumbuhan maksimal °C	Habitat asal	Kategori nutrisi	Rata – rata
Aerobs dan Facultative				
Aerobs				
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-85	Soils	Chemoheterotroph	14
<i>B. acidocaldarius</i>	70	Acid Soils	Chemoheterotroph	15
<i>B. caldotenax</i>	85	Soils, thermal springs	Chemoheterotroph	48
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	70	Soils, Compost	Chemoheterotroph	16
<i>Thermus aquaticus</i>	79	Thermal springs	Chemoheterotroph	17
<i>Thermomicrobium roseum</i>	85	Thermal springs	Chemoheterotroph	18
<i>Sulpholobus acidocaldarius</i>	85-90	Thermal springs	Chemoheterotroph	19
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	70-73	Thermal springs	Photothroph	20
<i>Synechococcus lividis</i>	70 – 74	Thermal springs	Photothroph	21
Obligate anaerobes				
<i>Clostridium thermocellum</i>	70	Soils,manure	Chemoheterotroph	22
<i>C. thermohydrosulphuricum</i>	76	Soils, Volcanic activity	Chemoheterotroph	23
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	75	Thermal spings	Chemoheterotroph	13
<i>Desulph vibrio thermophilus</i>	85	Geothermal Waters	Chemomixotroph	26
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	70-74	Thermal spings	Chemoautotroph	27

Sumber : Zeikus (1979)

Menurut Iman dkk. (2014), *B. subtilis* merupakan salah satu bakteri dari genus *Bacillus* yang dapat digunakan sebagai probiotik karena merupakan bakteri yang non patogen. *B. subtilis* dapat diisolasi dari berbagai lingkungan misalnya pada tanah dan akuatik. Bahan antibakteri yang terkandung di dalam supernatan



*B. subtilis* yaitu polymixin, colistin, circulin dan antibiotik peptid seperti subtilin, subtilosin A, Tas A dan sublancin.

Menurut Schaad (2001), bakteri tahan panas yang telah banyak diketahui adalah bakteri golongan *Bacillus* sp. Sebagian besar bakteri genus *Bacillus* sp. bersifat saprofitik. *Bacillus* sp. memiliki daya tahan hidup yang cukup tinggi khususnya terhadap suhu tinggi karena menghasilkan endospora tahan panas. Sehingga sangat potensial digunakan sebagai agens pengendali hayati patogen tumbuhan.

## 2.2 Patogen tanaman

### 2.2.1 *R. solani*

*R. solani* merupakan patogen tular tanah, patogen penyebab beberapa penyakit pada tanaman budidaya, patogen ini merupakan patogen penyebab penyakit Hawar pelepah daun padi. Menurut Aleoxopoulus dalam Sumartini 2012. Patogen *R. solani* diklasifikasikan ke dalam genus Thanatephorus, family Ceratobasidiaceae, ordo Tulasnellales, kelas Basidiomycetes.

Miselium berhialin dan berwarna gelap, sel miselium biasanya memanjang, septa bercabang dari hifa utama. Tidak memiliki konidia dan alat perkembangbiakan aseksual. Skelotia berwarna cerah, biasanya tumbuh secara parasite pada bagian akar atau bagian tanaman diatas permukaan tanah (Barnett dan Hunter, 1972).

Menurut Suryadi dkk. (2011) Cendawan *R. solani* dapat menyebabkan kerusakan hingga 50% pada tanaman padi tergantung lingkungan, ketahanan tanaman, tingkat pertumbuhan dan keparahan penyakit. Patogen ini memiliki inang yang luas, memiliki banyak strain, dan mampu bertahan lebih lama di tanah untuk membentuk aktif mycelia (sclerotia). Selain tanaman padi, *R. solani* bisa juga terinfeksi kacang, kedelai, dan tomat. Menurut Prayudi (2000), Inang alternatif untuk patogen tersebut cukup banyak diantaranya ialah kedelai, yang dapat menyebabkan penyakit layu semai, hawar daun, dan busuk polong.

### 2.2.2 *Phytophthora palmivora*

*P. palmivora* merupakan patogen penyebab penyakit busuk buah kakao. Cendawan *P. palmivora* merupakan Cendawan dari kelas Oomycetes yang memiliki ciri - ciri morfologi miselium panjang dan berwarna putih dengan spora berbentuk seperti buah pir (Drenth & Sendall, 2001). Menurut Erwin dan Ribeiro (1996) *P. palmivora* memiliki miselium *coenocytic* tanpa atau sedikit sekat dan di dalam air dapat menghasilkan zoosporangia. Oospora seksual terbentuk secara tunggal dalam oogonium setelah pembuahan oleh inti dari antheridium tersebut. Dinding sel mengandung selulosa mikrofibril dan B-1,3-glukan.

Menurut Liswarni (2011), Gejala serangan berupa adanya busuk hitam kecoklatan yang dimulai dari pangkal buah kemudian menyebar hampir menutupi seluruh permukaan buah dengan warna abu-abu keputih-putihan. Warna ini merupakan kenampakan dari hifa atau miselium dari Cendawan ini yang terdapat pada permukaan kulit buah. Perkembangan busuk pada buah cukup cepat, sehingga dalam waktu beberapa hari seluruh permukaan dan isi buah menjadi busuk keseluruhan. Gejala busuk biasanya lebih banyak pada buah yang dewasa. Apabila buah dibuka maka akan terlihat daging buah telah membusuk dan berwarna hitam serta biji menjadi rusak.

Menurut Arnawa *dkk.* (2012), Kerugian yang terjadi akibat serangan *P. palmivora* di beberapa Negara penghasil kakao. Kamerun, penyakit ini menurunkan 20-80%. Di Costa Rica, diperkirakan melalui percikan air hujan, hubungan langsung hingga 50%, di Brasil 15-30%, di Meksiko 80%, dan melalui dan Ghana 10-15%.

### 2.2.3 *Ralstonia solanacearum*

*R. solanacearum* bersifat gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran 0,5  $\mu\text{m}$  x 1,5  $\mu\text{m}$ , dapat bergerak dengan satu atau beberapa flagela, aerobik, dapat mereduksi nitrat dan memproduksi amonia. Bakteri ini diklasifikasikan menjadi Ras berdasarkan perbedaan kisaran inang dan Biovar berdasarkan sifat biokimia (penggunaan sumber karbon) (Aini, 2007).

Menurut Maharijaya *dkk.* (2008), *R. solanacearum* merupakan patogen penyebab penyakit layu bakteri. Layu bakteri ditemukan secara luas, banyak ditemukan pada wilayah tropis dan subtropis, namun juga ditemukan pada daerah temperatur dingin Layu bakteri bahkan dapat menurunkan produksi kentang sampai 80%. *R. solanacearum* merupakan patogen yang banyak menyerang tanaman dari family solanaceae, beberapa tanaman tersebut merupakan komoditas penting di Indonesia antara lain : Pisang, tomat, kentang, tembakau dan lainnya.

Gejala awal serangan *R. solanacearum* tanaman mulai layu. Kemudian menjalar ke daun bagian bawah. Gejala yang lebih lanjut : seluruh tanaman layu, daun menguning sampai coklat kehitam-hitaman, dan akhirnya tanaman mati. Serangan pada umbi menimbulkan gejala dari luar tampak bercak-bercak kehitam-hitaman, terdapat massa bakteri yang keluar dari mata tunas atau ujung stolon (Rukmana, 1997). Menurut Maharina *dkk.* (2014) produksi tomat pada tahun 2012 akibat serangan patogen *R. solanacearum* mengalami penurunan sebesar 6,96 %. Rata-rata produksi buah tomat di Indonesia pada tahun 2011 sebesar 954.046 ton, sedangkan pada tahun 2012 hanya 887.556 ton.

#### 2.2.4 *Xanthomonas oryzae pv oryzae*

Patogen *X. oryzae pv. oryzae* merupakan patogen penyebab penyakit HDB (Hawar Daun Bakteri), HDB merupakan penyakit penting pada pertanaman padi karena dapat menyebabkan kerusakan yang cukup tinggi pada tanaman budidaya. Bakteri *X. oryzae Pv. oryzae* (Xoo) bersifat gram negatif, berbentuk batang pendek dengan ukuran 0,45 - 0,75 x 0,65-2,1  $\mu$ , dengan satu flagella polar di salah satu ujungnya dengan ukuran 0,03-8,75  $\mu$ . Koloni bakteri berwarna kekuningan (Ou dalam Sudir *dkk.*, 2012).

Menurut Sudir *dkk.* (2012), Bakteri *X. oryzae pv. oryzae* (Xoo) dapat bertahan hidup dalam tanah, jerami tanaman terinfeksi, sisa-sisa tanaman (singgang = turiang), gabah (benih) dan gulma. Bakteri Xoo dapat bertahan di tanah selama 1-3 bulan, bergantung pada kelembapan dan kemasaman tanah. Bakteri Xoo dilaporkan dapat bertahan pada gulma seperti *Leersia sayanuka*, *L. japonica*, *Zezenia latifolia*, dan *Leptochloa chinensis* sebagai inang alternatif.

Menurut Wahyudi *dkk.* (2011) Gejala yang ditimbulkan oleh bakteri ini tergolong khas, yaitu mulai dari terbentuknya garis basah pada helaian daun yang akan berubah menjadi kuning kemudian putih. Gejala ini umum dijumpai pada stadium anakan, berbunga, dan pemasakan. Serangan penyakit pada tanaman yang masih muda dinamakan kresek, yang dapat menyebabkan daun berubah menjadi kuning pucat, layu, dan kemudian mati. Kresek merupakan bentuk gejala yang paling merusak. Serangan HDB di Indonesia menyebabkan kerugian hasil panen sebesar 21-36% pada musim hujan dan sebesar 18-28% pada musim kemarau. Luas penularan penyakit HDB pada tahun 2006 mencapai lebih dari 74 ribu ha, 16 ha diantaranya menyebabkan tanaman puso. Karakter iklim tropis juga menyebabkan banyaknya strain patogen yang ditemukan di wilayah tropis (Wahyudi *dkk.*, 2011).

### 2.3 Tipe Mekanisme Penghambatan Bakteri

Tipe mekanisme penghambatan bakteri dalam menghambat patogen ada dua tipe yaitu tipe bakteristatik dan bakterisidal. Tipe mekanisme bakteristatik dimana antibiotik tersebut hanya menekan pertumbuhan bakteri patogen namun tidak sampai membunuh patogen. Beberapa contoh antibiotik yang memiliki mekanisme bakteristatik yaitu clindamicin and chloramphenicol. Sedangkan bakterisidal merupakan dimana antibiotik bersifat membunuh bakteri patogen. Fluoroquinolones dan  $\beta$ -lactam (Penicillin). (Bertanova *et al.*, 2013)

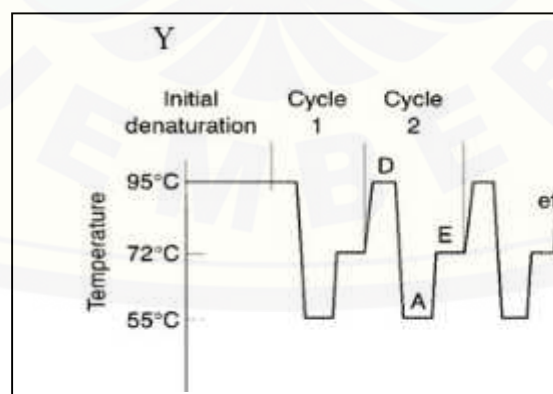
### 2.4. Sekuensing 16S rRNA

Metode sekuensing 16S rRNA dilakukan untuk mengetahui kekerabatan dari suatu spesies dengan spesies lainnya. Metode ini banyak digunakan untuk mengetahui spesies yang baru ditemukan dan di isolasi dari suatu tempat tertentu. Untuk melakukan sekuensing tersebut harus melalui beberapa tahap yaitu isolasi DNA, PCR dan pemurnian DNA product. Isolasi DNA

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan suatu teknik enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Dengan menggunakan metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan

bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar  $10^6$ - $10^7$  kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target (Joshi dan D, 2010).

Menurut Joshi dan D (2010), Tiga langkah utama dalam teknik PCR meliputi Denaturasi, Anealing dan Extension. Langkah pertama yaitu Denaturasi, memisahkan menjadi dua potong DNA tunggal helai / single stranded. berikutnya enzim “taq polimerasi” mensistesis menjadi dua untai DNA baru menggunakan helai asli sebagai template. Kemudian setiap pasangan untaian tersebut akan membuat salinan baru dan seterusnya. Tahap ini biasanya menggunakan suhu yang tinggi  $\pm 95^\circ\text{C}$ . berikutnya tahap annealing, tahap ini menggunakan suhu yang rendah  $\pm 50^\circ\text{C}$ , hal ini memungkinkan primer untuk berhibridisasi untuk melengkapi template yang asli. Untai DNA baru terbentuk primer yang melekat pada template kemudian digunakan untuk membuat salinan identik dari helai template asli yang diinginkan. kemudian tahap ketiga yaitu ekstensi yang akan terjadi sempurna pada suhu  $72^\circ\text{C}$  selama  $\pm 2$ -5 menit. Tahap ini merupakan tahap pemanjangan dari rangkaian DNA baru yang di duplikasi dari rangkaian DNA template.



Sumber : Joshi, 2010

Gambar 2.2 Tahapan proses PCR

Tahapan purifikasi dilakukan sesuai dengan prosedur yang terdapat dalam metode. Purifikasi bertujuan memurnikan produk PCR yang diperoleh dari pengotor yang mungkin ada pada produk PCR. Hasil purifikasi kemudian diuji dengan elektroforesis gel agarosa.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekular dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Penelitian dimulai pada bulan Juni 2016 – selesai.

### 3.2 Persiapan Penelitian

#### 3.2.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan di dataran pegunungan Kawah Ijen Kabupaten Bondowoso, Jawa Timur. Sampel tanah diambil dari 3 titik koordinat berbeda dengan masing – masing titik, koordinat I 08°03'37,33"LS dan 114°14'39,17"LU, II 08°03'36,83"LS dan 114°14'38,75", III 08°03'37,63"LS dan 114°14'37,99"LU, pengambilan titik koordinat menggunakan GPS maps 62 "Garmin". Pengambilan sampel tanah pada kedalaman 30 cm dengan menggunakan besi berdiameter  $\pm 2$  cm dan panjang 1 meter dengan cara menancapkan pada titik koordinat kemudian sampel di masukkan pada botol sampel. Sampel tanah di simpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 1 minggu.

#### 3.2.2 Isolasi Bakteri Termofilik

Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran (*dilution*). Sampel tanah 1 gr dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah air steril hingga volume 10 ml, lalu *dishaker*. Suspensi yang sudah *dishaker* di pipet sebanyak 1 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml air steril. Pengenceran berseri dilakukan sampai  $10^{-6}$ . Suspensi sebanyak 1 ml pada pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  dikulturkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media NA dan kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Mardinus, 2006).

### 3.2.5 Pemurnian Bakteri Termofilik

Pemurnian bakteri dilakukan dengan mengambil satu goresan pada koloni bakteri dengan jarum ose dan digoreskan pada cawan petri yang telah di tuangin media NA. Media tersebut di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C hingga di dapatkan isolat murni (Marista *dkk.*,2013).

### 3.2.6 Isolasi dan Cara Perbanyakkan Isolat Patogen

#### 3.2.6.1 Isolat Patogen Hawar Pelepah Daun Padi

Isolat patogen *R. Solani* diisolasi dari daun tanaman padi yang menunjukkan gejala penyakit. Isolasi dilakukan dengan memotong daun padi batas antara yang sehat dan yang sakit sebesar 1 cm x 1 cm menggunakan pisau steril dan dicelupkan ke dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit. Potongan kulit buah dibilas menggunakan aquades, kemudian dipindahkan pada kertas saring dan diletakkan secara aseptik di atas permukaan medium PDA. Isolat diinkubasi pada ruang kultur bersuhu 28°C selama 5 hari. Koloni yang tumbuh kemudian diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri morfologi dan dimurnikan untuk mendapatkan isolat murni Cendawan *R. solani*.

#### 3.2.6.2 Isolat Patogen *Phytophthora palmivora*

Cendawan *P. palmivora* diisolasi dari buah kakao yang terserang penyakit busuk buah. Isolasi dilakukan dengan cara memotong kulit bagian dalam buah batas antara yang sehat dan yang sakit sebesar 0,5 cm x 0,5 cm menggunakan pisau steril dan dicelupkan ke dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit. Potongan kulit buah dibilas menggunakan aquades, kemudian dipindahkan pada kertas saring dan diletakkan secara aseptik di atas permukaan medium PDA. Isolat diinkubasi pada ruang kultur bersuhu 28°C selama 5 hari. Koloni yang tumbuh kemudian diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri morfologi dan dimurnikan untuk mendapatkan isolat murni Cendawan *P. palmivora*.



### 3.2.6.3 Isolat Patogen *R. solanacearum* dan *X. oryzae* pv. *oryzae*

Bakteri yang digunakan pada penelitian berasal dari stok koleksi laboratorium, Divisi Biomolekular dan Bioteknologi (CDAST). Masing – masing Bakteri ditumbuhkan pada media CPG dan NB cair dengan mengambil 20  $\mu$ L dari stok. Bakteri yang telah ditumbuhkan pada media CPG dan NB digojok dengan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm. Isolat diinkubasikan pada suhu 28°C selama 1 hari.

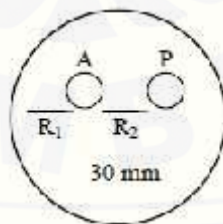
## 3.3. Prosedur Penelitian

### 3.3.2 Uji Daya Hambat *In vitro*

#### 3.3.1.1 Uji Daya Hambat Bakteri Termofilik pada Patogen Golongan Cendawan.

Pengujian daya hambat pada golongan Cendawan dilakukan pada patogen *R. solani* dan *P. palmivora*. Pengujian daya antagonis cendawan dilakukan dengan metode biakan ganda (*dual culture*) (Dharmaputra *et al.*, 1999), yaitu dengan cara mengambil masing-masing cendawan biakan murni cendawan *R. solani* dan *P. palmivora* dan cendawan antagonis uji menggunakan *cork borer* diameter 4 mm dengan ketebalan 3,5 mm. Kemudian diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium PDA secara berhadapan dengan jarak 30 mm. Kemudian diinkubasikan selama satu minggu pada suhu ruang dan di amati zona penghambatannya. (Gambar 3.1).

Skema penempatannya adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1.

Gambar 1. Skema penempatan cendawan patogen dengan cendawan antagonis uji dengan metode *dual culture*. P = potongan koloni cendawan patogen, A = potongan koloni cendawan antagonis uji, R<sub>1</sub> = jari-jari koloni patogen yang menjauhi koloni cendawan antagonis uji, R<sub>2</sub> = jari-jari koloni patogen yang mendekati koloni cendawan antagonis uji.

$$\text{Hambatan (\%)} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100\%$$

### 3.3.1.3 Uji Daya Hambat Bakteri Termofilik pada Patogen Golongan Bakteri.

Pengujian daya hambat pada patogen tanaman golongan bakteri dilakukan pada patogen *X. oryzae* pv. *oryzae* dan *R. solanacearum*. Pengujian dilakukan dengan metode *double layer agar*. Bakteri antagonis ditumbuhkan pada media YPGA dalam petridish, masing-masing petridish 1 titik biakan, kemudian menginkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah inkubasi petridish dibalik dan pada tutupnya ditetesi dengan 1 ml kloroform dan dibiarkan selama 2 jam hingga semua kloroform menguap kemudian petridish dibalik seperti keadaan semula. Sebanyak 0,2 ml suspensi *X. oryzae* pv. *oryzae* dan *R. solanacearum* yang berumur 24 jam dicampur dengan 4 ml agar air 0,6 % suhu 28°C, dan dituang di atas biakan bakteri antagonis. Hasilnya kemudian diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam (Addy,2007)

### 3.3.1.3 Uji Tipe Mekanisme Penghambatan Bakteri dan Cendawan (Bakterisidal / Fungisidal / Fungistatik atau Bakteriostatik)

Cara untuk mengetahui mekanisme penghambatan, agar yang berada pada zona hambatan diambil secara aseptis dengan menggunakan scalpel steril dan kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 1% air pepton dan dihancurkan menggunakan jarum preparat. Air pepton yang berisi agar kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu 28°C. Air pepton yang menjadi keruh maka menunjukkan Bakteri tersebut memiliki sifat bakteriostatik. Air pepton yang tidak menjadi keruh terus dishaker selama lima hari dan jika tetap tidak keruh, maka mekanisme penghambatan bersifat bakterisidal (Aini, 2007).

### 3.3.1.4 Uji Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan starter dilakukan dengan mengambil 20µL isolat bakteri dari glicerol stok kemudian di kulturkan pada 4 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Kemudian bakteri starter diambil 2 ml dan di kulturkan pada media NB 100 mL. Kultur bakteri di inkubasi pada variasi suhu 28°C, 37°C dan 45°C dan 80°C selama 72 jam. Kemudian suspensi bakteri di hitung kerapatannya dengan alat spektrofotometer pada OD<sub>600</sub>. Kemudian di amati setiap

6 jam dan menggambar kurva pertumbuhan bakteri (Khoiriyah dan Ardiningsih,2014).

### 3.3.1.5 Ekstraksi dan Deteksi Senyawa Antibiotik

Untuk mengetahui jumlah macam senyawa antimikrobia yang distimulasi maka dilakukan ekstraksi dan deteksi senyawa antimikrobia dari bakteri antagonis. Ekstraksi senyawa antimikrobia bakteri antagonis dilakukan dengan mengikuti Duffy dan Defago (1999). Filtrat kultur bakteri pada medium cair uji yang mengandung stimulan dengan konsentrasi terbaik sebanyak 20 ml diambil dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 4.500 rpm untuk memisahkan bakteri dengan metabolitnya yang terdifusi ke dalam medium cair, kemudian pH nya diatur menjadi pH 2 dengan menambahkan 700  $\mu$ l HCl 1 M. Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 20 ml etil asetat pada supernatan yang diperoleh dari pemisahan lalu digojok dengan *rotary shaker* selama 30 menit pada 150 sampai 200 rpm. Tahap pemisahan antara substansi metabolit yang terlarut dan tidak terlarut dipercepat dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 4.500 rpm, setelah itu fase pelarut organik dipindahkan pada labu evaporator dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu yang terbentuk dilarutkan dengan 1 ml metanol.

Deteksi senyawa antibiotik dilakukan dengan *Thin Layer Chromatography* (TLC). Pengujian dilakukan dengan menggunakan plat Aluminium silica gel 60 F<sub>254</sub>. Pengujian dilakukan dengan meneteskan 10  $\mu$ L masing – masing ekstrak dengan mikropipet 10 $\mu$ L dengan jarak antar sampel 1,5cm, 2 cm dari sisi bawah dan 1 cm dari sisi samping. Setelah itu plat TLC dikembangkan dalam larutan pengembang berupa metanol : air (70:30) setinggi 1 cm dari sisi bawah dan di biarkan mengembang hingga 1 cm dari sisi atas. Plat dibiarkan mengering dan diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 362 nm lalu di tandai noda senyawa yang terbentuk dan dihitung nilai faktor retensinya ( $R_f$  = Perbandingan jarak munculnya noda dengan jarak yang di tempuh larutan pengembang) (Addy,2007).

Untuk mengetahui jumlah macam senyawa antimikrobia dilakukan bioassay menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*) terhadap masing - masing spot pada Rf tertentu dengan cara mengerok tiap spot yang selanjutnya disuspensikan dalam 1 ml air steril (4 ulangan spot dalam 1 ml air steril). Selanjutnya ditetaskan pada media yang telah ditaburi dengan suspensi patogen dan diinkubasikan selama 24 jam. Suspensi yang tampak zona bening menunjukkan bahwa suspensi tersebut mengandung senyawa antimikrobia.

#### 3.3.1.6 Uji daya hambat senyawa antibiotik terhadap patogen cendawan dan bakteri

Pengujian daya hambat senyawa antibiotik bakteri termofilik dilakukan untuk mengkonfirmasi senyawa yang menunjukkan aktifitas penghambatan terhadap perkembangan patogen cendawan (*R. solani* dan *P. palmivora*) dan bakteri (*X. oryzae* pv. *oryzae* dan *R. solanacearum*). Pengujian ini dilakukan dengan meneteskan 1 ml suspensi cendawan dan bakteri target ke dalam 9 ml medium NB yang belum membeku dan di vortex lalu di tuang dalam petridish yang telah berisi media hingga membeku. Kemudian Teteskan 10 µl konsentrasi filtrasi bakteri antagonis dengan perlakuan pengenceran pada medium NA yang telah di inokulasikan patogen. Pengamatan zona bening dilakukan setelah 24 - 48 jam (Addy,2007).

#### 3.3.1.7 Metode Sekuensing 16S rRNA

Isolasi DNA dari kelima sampel bakteri termofilik dilakukan dengan menggunakan kit Zymo-tech, setelah mendapatkan DNA dari bakteri tersebut kemudian di simpan di suhu -20°C. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan primer universal 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') dan 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dengan program Pre – denaturasi 95°C 3 menit ; denaturasi 95°C 30 detik ; annealing 55°C 1 menit ; Extention 72°C 1 menit ; final extention 72°C 5 menit dan di inkubasi pada 4°C. Hasil PCR di purifikasi menggunakan menggunakan GEL/PCR DNA Fragments Extraction kit kemudian hasil purifikasi di kirim ke PT. Genetika Science. Data

hasil sekuensing dilanjutkan untuk pembuatan pohon filogenetik (*Phylogenetic Tree*).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi menunjukkan bahwa hanya terdapat 4 isolat yang memiliki potensi penghambatan terhadap patogen. Ke-4 isolat tersebut yaitu isolat *A. Baumannii* strain KW-A dapat menghambat pertumbuhan patogen *R. solanacearum*, isolat *A. baumannii* strain KI-D dapat menghambat pertumbuhan *R. solani* dan *P. palmivora*, isolat *A. baumannii* strain KI-H dapat menghambat patogen *P. palmivora* memiliki potensi penghambatan terhadap patogen *R. solanacearum*, *P. palmivora* dan *R. solani*. Isolat *Enterobacter* sp strain KW-D dapat menghambat patogen *R. solanacearum* dan *X. oryzae* Pv. *oryzae*. Ke-4 isolat bakteri tersebut memiliki tipe penghambatan bakteristatik. Namun, untuk ekstrak kultur filtrat yang telah dilakukan tidak menunjukkan adanya aktifitas penghambatan karena tidak kesesuaian metode ekstraksi dengan senyawa antimikrob yang diproduksi oleh isolat bakteri hasil isolasi.

Menurut hasil analisis sekuensing yang telah dilakukan menunjukkan 3 dari ke-4 isolat tersebut memiliki kekerabatan yang sama yaitu isolat KW-A, KI-D dan KI-H memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan *A. baumannii*, sedangkan isolat KW-D memiliki kekerabatan dengan genus *Enterobacter* sp.

### 5.2 SARAN

Perlu dilakukan tahap pengkajian ulang pada tahap pemilihan metode ekstraksi karena dalam penelitian ini tidak didapatkan aktifitas penghambatan dari hasil ekstraksi kultur filtrat karena ketidaksesuaian antimikrob yang dihasilkan dengan metode yang digunakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H.S. 2007. Pengaruh sumber mineral terhadap penekanan *Erwinia carotovora* oleh *Pseudomonas pendar-fluor* secara *in vitro*. *Hpt Tropika*, 7 (2) : 117 – 124.
- Aini, E.N. 2007. Efektifitas beberapa isolat *Bacillus* spp. dalam menghambat *Ralstonia solanacearum* pada cabai. *Skripsi*. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Arnawa, G., Suharman, M. J. Sianturi, B. Lesmana, dan M. Syahrir. 2012. *Penerapan budidaya terbaik tanaman kakao*. Medan : swisscontact.
- Awais, M., A. Perez., A. Yaqub dan M.M. Shah. 2010. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel. *Pakistan J.Zool*, 42 (3) : 267-275.
- Baker, G., Gaffar, S., Cowan, D. A., Suharto A. R. 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiology Letters*, 200 (1) : 103- 109.
- Barnett, H.L dan B.B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi, 4th edition. *Mycologia*, 1-216.
- Bernatová, S, O. Samek, Z. Pilát, M. Šerý J. Ježek, M. Šiler, V. Krzyžánek, P. Zemánek, V. Holá, P. Jákł , M. Dvoráková dan F. Ružicka. 2013. Following the mechanisms of bacteriostatic *versus* bactericidal action using raman spectroscopy. *Molecules*, 18 : 13188-13199.
- Brock, Thomas D. 1978. “Thermophilic microorganisms and life at high temperatures”, Springer-Verlag.
- Devi, P., C. Rodrigues., C.G. Naik dan L. D’souza. 2012. Isolation and characterization of antibacterial compound from a mangrove-endophytic fungus, *Penicillium chrysogenum* mtcc 5108. *Indian J. Microbiol*, 52 (4) : 617 – 623.
- Dharmaputra, O.S., A.W. Gunawan, R. Wulandari, dan T. Basuki. 1999. Cendawan kontaminan dominan pada bedengan cendawan merang dan interaksinya dengan cendawan merang secara *in vitro*. *J. Mikro. Indonesia*, 4 (1) : 14-18.

- Drenth A. dan Sendall B. 2001. Pratical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Crc for tropical plant protection, Brisbane, Australia. 41 p.
- Duffy, B.K dan G. Defago. 1999. Environmenal factor modulating antibioic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Evironmental microbiology*, 65 (6) : 2429 – 2438.
- Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro, 1996. *Phytophthora palmivora* var. palmivora. *Dalam: D. C. Erwin, and O. K. Ribeiro. Phytophthora Diseases Worlwide.* American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. p. 408-421.
- I Gusti, A.L.T. 2010. Residu insektisida sidazinon pada kacang panjang (*Vigna sinensis*) yang dihasilkan di desa tunjuk selatan,kecamatan tabanan, kabupaten tabanan. *Masalah Lingkungan di Indonesia*, 1 (1) : 605- 612.
- Iman, E.R.S., M.A. Waskita., M. Lamid. 2014. Daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Veterinaria Medika*, 7 (2) : 106-113.
- Jaouen,T., E. De´., S. Chevalier dan N. Orange. 2004. Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein oprf in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol*, 70 (11) : 6665- 6669.
- Joshi, M dan D. J.P. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Ijbr*, 1 (5) : 81-97.
- Khaeruni dan Rahman. 2013. Efektivitas limbah cair pertanian sebagai media perbanyak dan formulasi *Bacillus subtilis* sebagai agens hayati patogen tanaman. *J. Agroteknos* , 3 (3) : 144-151.
- Khoiriyah,H dan P. Ardiningsih. 2014. Penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas bakteriosin *Lactobacillus* Sp. Red4. *Jkk*, 3 (4) : 52-56.
- Lasa I., Berenguer J., 1993. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiologia SEM*,, 9 (2) : 77-89.
- Liswarni,Y. 2011. Insidensi penyakit busuk buah (*Phytophthora palmivora* bult.) Pada tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) Di sentra produksi kakao kabupaten pasaman barat. *Manggara*, 12 (2) : 43-48.
- Liu, C. H., X. Chen., T. T. Liu., B. Lian., Y. Gu., V. Caer., Y. R. Xue dan B. T. Wang. 2007. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Appl Microbial Biotechnol*, 76 (1) : 459-466.

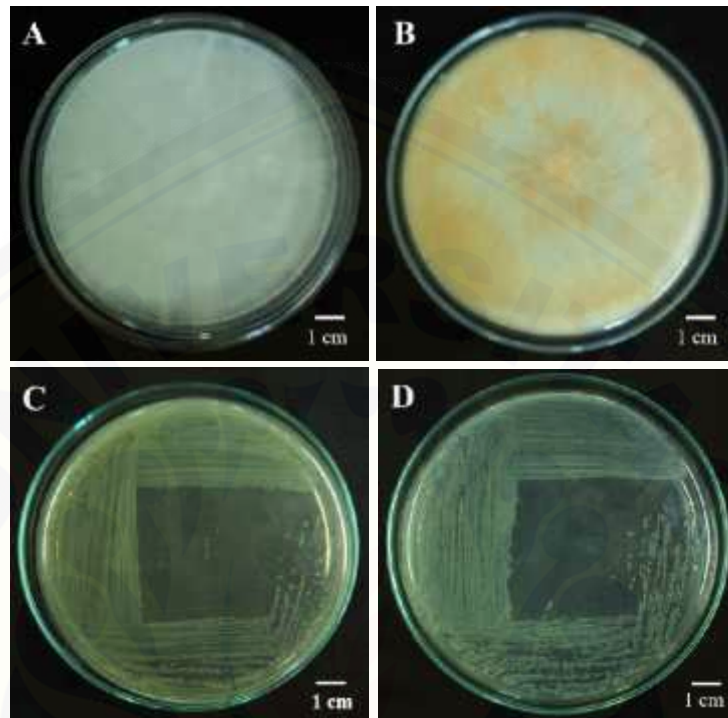


- Maharijaya, A., M. Mahmud dan A.Purwito. 2008. Uji ketahanan *in vitro* klon-klon kentang hasil persilangan kentang kultivar atlantic dan granola terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) dan busuk lunak (*Erwinia carotovora*). *Agron*, 36 (2) : 133 – 138.
- Maharina, K.E., L.Q. Aini dan T. Wardiyani. 2014. Aplikasi agens hayati dan bahan nabati sebagai pengendalian layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada budidaya tanaman tomat. *Produksi Tanaman*, 1 (6) : 506 - 513.
- Mardinus. 2006. *Cendawan patogen tumbuhan*. Universitas Andalas Padang.
- Marista, E., S. Khotimah dan R. Linda. 2013. Bakteri pelarut fosfat hasil isolasi dari tiga jenis tanah rizosfer tanaman pisang nipah (*Musa Paradisiaca* Var. Nipah) di Kota Singkawang. *Protobiont*, 2 (2) : 93 -101.
- Nawangsih, A.A., T. Widjayanti dan Y. Anisa. 2014. Kelimpahan bakteri rizosfer pada sistem pht – biointensif serta kemampuan antagonismenya terhadap *Sclerotium rolfsii* pada kedelai. *J. HPT Tropika*, 14 (2) : 110 – 120.
- Pal, K. K. And B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* p 1-25.
- Pankey,G.A dan L.D. Sabath. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram- positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38 : 864–870.
- Prayudi,B. 2000. Toleransi padi lokal rawa pasang surut terhadap penyakit hawar pelepah daun padi (*R. solani*). *Bol. Agron*. 28 (2) : 37 40.
- Pscheidt, B.J.W. 2011. *Plant Diseases*. Kentucky Master Gardener Manual Chapter 6. University of Kentucky. p 83-94.
- Qing-Yun Xue, QY., Y. Chen., S.M. Li., L.F. Chen., G.C. Ding., D.W. Guo., J.H. Guo. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48 (1) : 252-258.
- Rakhmawati,A dan E. Yulianti. 2012. Eksplorasi bakteri termofilik pasca erupsi merapi sebagai penghasil enzim ekstraseluler. *J. Penelitian Saintek*, 17 (1) : 1-12.
- Rukmana, R. 1997. *Kentang budidaya dan pasca panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Schaad NW. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* 3rd Ed. Minnesota: APS Press. St. Paul.

- Soenartiningih, M. Akil dan N.N. Andayani. 2015. Cendawan tular tanah (*Rhizoctonia solani*) penyebab penyakit busuk pelepah pada tanaman jagung dan sorgum dengan komponen pengendaliannya. *Iptek Tanaman Pangan*, 10 (2) : 85-92.
- Someya, N., K. Tsuchiya, & K. Akutsu. 2005. Negative interactions between antagonistic microbes phytopathogens p: 25 – 29 in proc. Of the asian conference on emerging trends in plant – microbe interactions. (Gnanamanickam *et al.*. (Eds). Univ. Of Madras Chennai, India.
- Sudir., B. Nuryanto Dan T.S. Kadir. 2012. Epidemiologi, patotipe, dan strategi pengendalian penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi. *Iptek Tanaman Pangan*, 7 (2) : 79-87.
- Sumartini. 2012. Penyakit tular tanah (*Sclerotium rolfsii* dan *Rhizoctonia solani*) pada tanaman kacang kacangan dan umbi-umbian serta cara pengendaliannya. *Litbang Pertanian*, 31(1) : 27-34.
- Supriatin, Y., I. Nyoman. P. A dan R. Handriani. 2008. Kajian produksi biogas skala laboratorium dengan inokulum konsorsium alami metanogen dari lumpur waduk Jatiluhur dalam substrat bungkil jarak pagar (*Jatropha curcas* L). *BIOSFER, J. Bio. & Pend. Bio* 1 (1) : 51-59.
- Tjahjadi, N. 1989. *Hama dan penyakit tanaman*. Yogyakarta : Kanisius.
- Wahyudi, A. T., S. Meliah dan A. A. Nawangsih. 2011. *Xanthomonas oryzae* P.v. *oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: isolasi, karakterisasi, dan telah mutagenesis dengan transposon. *Makara Sains*, 15 (1) : 89-96.
- Woitke, M. 2004. *Bacillus subtilis* as growth promotor in hydroponically grown tomatoes under saline conditions. *Acta Hort*, 659 (1) : 363-369.
- Y. Suryadi., D.N. Susilowati, K.E. Putri., dan N.R. Mubarik. 2011. Antagonistic activity of indigenous Indonesian bacteria as the suppressing agent of rice fungal pathogen. *J. Int. Environmental Application & Science*, 6 (4): 558-568.
- Zeikus, J.G. 1979. Thermophilic bacteria : ecology, physiology and technology. *Enzyme Microb. Technol*, 1 (1) : 243 – 252.

**LAMPIRAN**

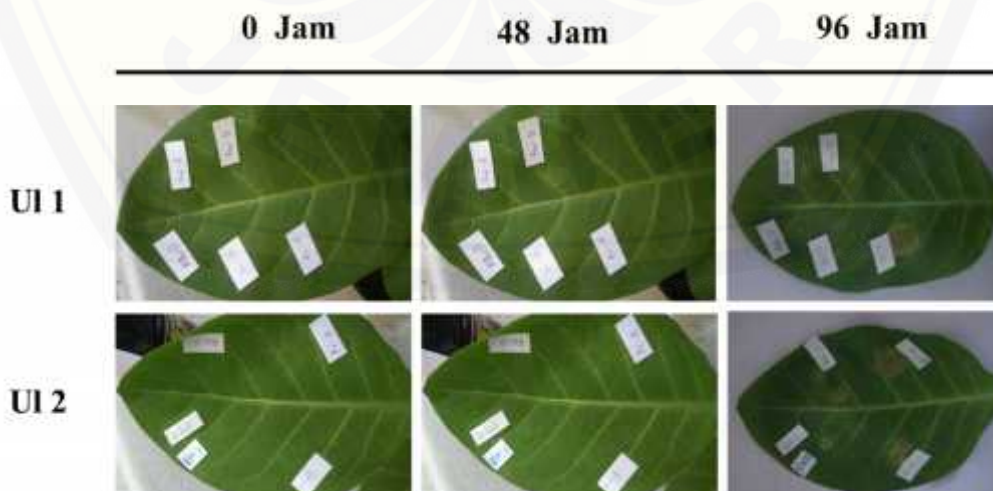
1. Hasil isolasi dan Peremajaan isolat patogen



Isolat patogen yang telah diisolasi dan diremajakan pada medium, isolat *P. palmivora* (A), *R. solani* (B), *R. solanacearum* (C) dan *X.oryzae* Pv *oryzae*

2. Uji Hipersensitif respon

**Uji Hipersensitif Respon**



Pengujian hipersensitif respon ke-4 isolat yang diisolasi dari Dataran Kawah Ijen dengan kerapatan  $10^8$ . Ke-4 isolat tersebut tidak menunjukkan gejala

klorosis dan nekrosis pada 48 jam setelah inokulasi, namun pada 96 jam setelah inokulasi menunjukkan adanya gejala daun menguning kecoklatan dan mengering disekitar tempat inokulasi. Hal ini menunjukkan uji HR yang dilakukan bersifat positif.

