

# Uji aktivitas antagonistik beberapa isolat *Bacillus* spp. terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada beberapa varietas tomat dan identifikasinya

## Antagonistic activity and identification of some isolates of *Bacillus* spp. against Bacterial Wilt Diseases (*Ralstonia solanacearum*) in some varieties of tomato

RACHMAD SAPUTRA<sup>1,\*</sup>, TRIWIDODO ARWIYANTO<sup>2,\*\*</sup>, ARIF WIBOWO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Fitopatologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Jl. Flora, Bulaksumur, Sleman 55281, Yogyakarta. \*email: rachputra528@gmail.com.

<sup>2</sup> Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Jl. Flora, Bulaksumur, Sleman 55281, Yogyakarta. \*\*email: tarwiyanto@yahoo.com.

Manuskrip diterima: 21 April 2015. Revisi disetujui: 20 Mei 2015.

**Abstrak.** Saputra R, Arwiyanto T, Wibowo A. 2015. Uji aktivitas antagonistik beberapa isolat *Bacillus* spp. terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada beberapa varietas tomat dan identifikasinya. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1116-1122*. *Ralstonia solanacearum* merupakan bakteri patogen penting yang sering menyerang tanaman tomat yang menyebabkan penyakit layu. Telah banyak upaya yang dilakukan untuk mengendalikan penyakit ini baik melalui praktek budidaya, penggunaan pestisida kimia maupun pengembangan varietas tahan, namun semua menunjukkan keberhasilan yang terbatas. Karena terbatasnya efektivitas dari beberapa pengendalian tersebut, penyakit layu bakteri tetap menjadi masalah serius secara ekonomis. Oleh karenanya, pengendalian hayati masih menjadi perhatian hingga saat ini. Dari sekian banyak bakteri antagonis, *Bacillus* spp. dan *Pseudomonas* spp. adalah yang paling banyak digunakan dalam pengendalian hayati penyakit tumbuhan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Bacillus* yang mampu menekan perkembangan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat dan mengidentifikasinya. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan dan rumah kaca Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Isolat *Bacillus* merupakan hasil isolasi dari rizosfer tanaman tomat. Berdasarkan hasil penelitian, enam isolat *Bacillus* yang digunakan menunjukkan kemampuan yang beragam dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri, namun *Bacillus* sp. isolat Ba-1 dan Ba-3 menunjukkan kemampuan yang cenderung lebih baik dibandingkan isolat lainnya. Hasil identifikasi secara biokimia mengindikasikan enam isolat *Bacillus* yang digunakan memiliki kemiripan sifat. Homologi *Bacillus* sp. isolat Ba-1 dan Ba-3 berdasarkan gen 16S rRNA dari hasil BLAST menunjukkan bakteri ini berkerabat dekat dengan *Bacillus licheniformis* strain DSM 13T (NR 118996) dan *Bacillus licheniformis* strain ATCC 14580T (NR 074923) dengan homologi mencapai 99%.

**Kata kunci:** *Bacillus licheniformis*, layu bakteri, pengendalian biologi, *Ralstonia solanacearum*, tomat

**Singkatan:** YPGA = Yeast Peptone Glucose Agar; AUDPC = Area Under Disease Progress Curve; PCR = Polymerase Chain Reaction

**Abstract.** Saputra R, Arwiyanto T, Wibowo A. 2015. Antagonistic activity assay of some isolates of *Bacillus* spp. against Bacterial Wilt Diseases (*Ralstonia solanacearum*) in some varieties of tomato and its identification. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1116-1122*. *Ralstonia solanacearum* is an important bacterial plant pathogen that frequently attacks in tomato plants and causes wilt disease. A great number effort has practiced minimizing this disease such as farming practices, the use of chemical pesticides and the development of resistant varieties, however, all showed limited success. Due to the limited effectiveness of some of these controls, yet bacterial wilt disease remains a serious problem economically. Therefore, biological control is still a great concern today. Of the many antagonistic bacteria, *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. are the most widely used in the biological control of plant diseases. The purposes of this study were to identify *Bacillus* spp. and investigate the capability of *Bacillus* isolates to suppress the development of bacterial wilt in tomato plants. The research was conducted at the Laboratory of Plant Bacteriology and greenhouse, Department of Plant Pest and Diseases, Faculty of Agriculture, UGM. *Bacillus* isolates were isolated from the rhizosphere of tomato plants. Based on the results of the study, six isolates of *Bacillus* showed diverse capabilities in suppressing the development of bacterial wilt disease, but *Bacillus* sp. isolate Ba-1 demonstrated the ability tends to be better than the other isolates. The biochemical identification results revealed that six isolates of *Bacillus* have similar properties. Homology of *Bacillus* sp. isolate Ba-1 by 16S rRNA gene of BLAST result showed this bacterium is closely related with *Bacillus licheniformis* strain DSM 13<sup>T</sup> (NR 118996) as the homology between them was 99%.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, bacterial wilt, biological control, *Ralstonia solanacearum*, tomato

## PENDAHULUAN

Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) merupakan salah satu sayuran penting di Asia dan Afrika. Kedua benua ini menurut laporan dapat memproduksi lebih dari 65% tomat di dunia (Srinivasan 2010). Selama masa pertumbuhannya, tanaman yang termasuk dalam famili *Solanaceae* ini banyak mendapatkan gangguan baik dari hama maupun patogen tanaman yang dapat menurunkan tingkat produksinya. *Ralstonia solanacearum* merupakan patogen penting yang sering menyerang tanaman tomat yang menyebabkan penyakit layu bakteri (Semangun 2006).

*Ralstonia solanacearum* merupakan bakteri patogen tanaman tular tanah yang banyak ditemukan di daerah subtropis dan tropis yang secara alami menginfeksi perakaran dan memperbanyak diri di dalam jaringan xilem (Yabuuchi et al. 1995). Bakteri ini memiliki kisaran inang yang sangat luas semenjak spesies tanaman yang rentan terhadap patogen ini telah diamati terjadi pada ratusan spesies tanaman dari sekitar 50 famili tanaman (Hayward 1991). Sebuah studi yang dilakukan di India menunjukkan bahwa layu bakteri dapat menimbulkan kerugian hingga 90% pada tomat selama musim panas. Setiap tahun, 15% dari lahan di Carolina Selatan, Amerika Serikat dipengaruhi oleh layu bakteri. Kehilangan hasil akibat penyakit ini telah diperkirakan berkisar 1-5% (Elphinstone 2005).

Telah banyak upaya yang dilakukan untuk meminimalkan penyakit melalui praktek-praktek budidaya dan pengembangan varietas tahan, namun semua menunjukkan keberhasilan yang terbatas (Maji dan Chakrabarty 2014). Fumigasi tanah dengan metil bromida maupun kloropikrin juga menunjukkan hal yang sama. Karena terbatasnya efektivitas dari beberapa pengendalian tersebut, penyakit layu bakteri tetap menjadi masalah serius secara ekonomis (Hayward 1991).

Metode pengendalian biologis telah dipelajari selama lebih dari 60 tahun karena tidak ada pestisida kimia yang efektif yang dapat digunakan. Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa pengendalian hayati terhadap bakteri layu dapat dicapai dengan menggunakan beragam mikroorganisme yang menguntungkan. Agens biologi potensial yang dapat digunakan untuk mengendalikan penyakit layu bakteri pada tomat di antaranya adalah mutan avirulen dari *R. solanacearum* (Dong et al. 1999), dan beberapa rhizobakteri antagonis seperti *Bacillus* spp. (Wei et al. 2011), *Pseudomonas* spp. (Vanitha et al. 2009), *Streptomyces* spp. (Boukaew et al. 2011), *Acinetobacter* sp. dan *Enterobacter* sp. (Xue et al. 2009). *Bacillus* spp. dan *Pseudomonas* spp. adalah yang paling banyak digunakan dalam pengendalian hayati penyakit tumbuhan. Penggunaan bakteri pengendali hayati telah banyak menunjukkan keberhasilannya. Arwiyanto et al. (2007) mendapatkan tiga isolat *Bacillus* spp. yaitu Ba-4, Ba-22 dan Ba-24 yang mampu menghambat tiga jenis isolat *R. solanacearum* yang diisolasi dari lahan tembakau di daerah Temanggung.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Bacillus* yang mampu menekan perkembangan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat dan kemudian mengidentifikasinya.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan dan di Rumah Kaca Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret 2014 hingga bulan Mei 2015. Pada penelitian ini digunakan enam isolat *Bacillus* sp. (Ba-1, Ba-3, Ba-4, Ba-9, Ba-11 dan Ba-16) hasil isolasi dari rizosfir tanaman tomat dan bakteri *Ralstonia solanacearum* hasil isolasi dari perakaran tanaman terung.

### Cara kerja

*Uji antagonisme secara in vitro terhadap R. solanacearum*

Uji antagonisme dilakukan secara *in vitro* dengan teknik yang dikembangkan oleh Arwiyanto (1997). Bakteri antagonis ditumbuhkan dengan cara mengambil koloni bakteri dengan menggunakan tusuk gigi steril lalu dititikan pada medium YPGA yang telah ditentukan secara simetri satu sama lainnya pada satu cawan petri. Biakan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 29°C. Setelah diinkubasi cawan dibalik dan ditambahkan 1 mL kloroform, kemudian dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah semua uap kloroform menguap, cawan petri dibalik pada posisi semula, kemudian dituangkan suspensi 200 µL *R. solanacearum* dalam 4 mL agar air 0,6%. Biakan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 29°C untuk mengamati zona hambatan. Setelah periode inkubasi dicatat isolat yang menghasilkan senyawa penghambat yang ditandai dengan adanya zona penghambatan di sekitar koloni bakteri antagonis. Zona penghambatan diukur dan dinyatakan dalam milimeter. Deteksi mekanisme penghambatan dilakukan dengan metode menurut Arwiyanto (1997).

### *Pengujian penekanan penyakit layu bakteri di rumah kaca*

Enam isolat *Bacillus* spp. digunakan sebagai perlakuan yang akan diuji. Tanaman tomat yang tidak diperlakukan dengan *Bacillus* spp. dan hanya diinokulasikan dengan *R. solanacearum* digunakan sebagai kontrol positif. Perlakuan tersebut diberikan ke empat varietas tomat secara terpisah, yakni varietas Melinda, Permata, Tombatu dan Kingkong. Perlakuan yang diuji disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) di dalam pot yang terdiri atas 3 tanaman setiap pot dan masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

Isolat *Bacillus* spp. masing-masing ditumbuhkan dan diperbanyak pada medium YPGA. Isolat tersebut selanjutnya disuspensikan pada air steril dalam bentuk terpisah dengan tingkat kerapatan populasi  $10^8$  cfu/mL sebagai sumber inokulum. Inokulasi *Bacillus* spp. pada bibit tomat berumur 21 hari dilakukan dengan cara merendam akar dalam suspensi bakteri antagonis tersebut selama 15 menit. Bibit yang telah diinokulasikan ditanam dalam pot berdiameter 10 cm, dan selanjutnya ditempatkan di rumah kaca dan dibiarkan selama 1 minggu. *R. solanacearum* diinokulasikan setelah 1 minggu aplikasi *Bacillus* spp dengan cara menyiramkan suspensi dengan kerapatan populasi  $10^8$  pada perakaran yang sebelumnya telah dilukai menggunakan pisau skalpel steril.

Penilaian perkembangan penyakit layu bakteri ditentukan dengan intensitas penyakit (%) dengan sistem skala mengacu pada Arwiyanto dan Hartana (1999) sebagai berikut: Skore 0 = Semua daun sehat, skore 1 = 1 - < 10% daun layu, skore 2 = 10 - < 30% daun layu, skore 3 = 30 - < 60% daun layu, skore 4 = 60 - < 100% daun layu dan skor 5 = 100% daun layu (tanaman mati). Intensitas penyakit dihitung dengan rumus:

$$IP = \frac{\sum_{i=1}^k kx_{nk}}{ZxN} \times 100$$

Keterangan :

- nk = jumlah tanaman yang terserang penyakit dengan skala k (k = 0, 1, 2, 3, 4, 5)  
 N = jumlah tanaman yang diinokulasi  
 Z = skala penyakit tertinggi

Kemudian dihitung pula laju perkembangan penyakit dengan rumus mengacu pada Van Der Plank (1963) dan nilai luas areal di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC) dengan rumus mengacu pada Jeger dan Viljanen-Rollinson (2001).

#### Identifikasi *Bacillus spp.*

Identifikasi *Bacillus spp.* meliputi uji fisiologis dan biokimia yang terdiri dari uji gram, katalase, oksidase, kebutuhan oksigen (oksidatif-fermentasi), hidrolisis gelatin, pati, pembentukan levan, uji *Voges Proskauer*, arginine dehidrolase, motilitas, toleransi pertumbuhan bakteri pada beberapa suhu, pH dan konsentrasi HCl, penggunaan dan perombakan senyawa karbon, sitrat serta nitrogen (Lelliot dan Stead 1987; William et al. 1989; Chun dan Vidaver 2001).

Identifikasi secara molekuler dilanjutkan untuk bakteri yang menunjukkan kemampuan yang terbaik. Ekstraksi DNA bakteri dilakukan berdasarkan metode miniprep yang dimodifikasi (Berlian 2012). DNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer universal 63F (5'- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1378R (5'- GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Pereaksi PCR yang digunakan untuk setiap reaksi yaitu 12,5 µL Kappa *ready mix*, masing-masing 1 µL *primer forward* dan *reverse*, 1 µL DNA dan air destilasi steril hingga total volume 25 µL. Selanjutnya dilakukan amplifikasi pada mesin PCR (*thermo cycler*) dengan program denaturasi awal 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus yang meliputi denaturasi kedua 95°C selama 30 detik, *annealing* 50°C selama 30 detik, *Extension* 72°C selama 1 menit dan dilanjutkan dengan *final extension* 72°C selama 2 menit lalu diakhiri dengan *final hold* pada suhu 4°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi dicek pada gel agarose 1,5% yang dielektroforesis dengan 100 volt selama 30 menit dalam bufer TE. Pengukuran fragmen DNA menggunakan penanda 100 bp DNA *ladder*.

Produk PCR kemudian disekuensing. Hasil peruntukan sekuen nukleotida 16S DNA ribosomal dianalisis dengan software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang terdapat di situs *National Center for Biotechnology*

*Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) untuk mengetahui tingkat kekerabatan terdekat dengan bakteri yang ada di dalam database *GenBank* (NCBI). Selanjutnya sekuen 16S DNA ribosomal dari bakteri diambil untuk analisis pohon filogenetik. *Multiple Sequence Alignment* dan konstruksi pohon filogenetik dianalisis menggunakan program MEGA6. Pohon filogenetik disusun dengan metode *neighbor-joining algorithm*, dengan stabilitas pengelompokan menggunakan analisis *bootstrap* dengan 1000 kali ulangan.

#### Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan ANOVA menggunakan SPSS 16. Untuk mengetahui perbedaan di antara perlakuan, maka dilakukan uji jarak berganda duncan (DMRT) pada taraf nyata 5%. Selain itu data juga akan di analisis secara deskriptif dan ditambahkan dalam bentuk grafik maupun gambar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji antagonisme secara *in vitro* terhadap *Ralstonia solanacearum*

Hasil uji antagonisme secara *in vitro* dari enam isolat *Bacillus spp.* terhadap *R. solanacearum* yang ditumbuhkan secara berlapis pada medium YPGA menunjukkan hasil yang hampir seragam (Tabel 1). Hanya satu isolat yang mampu menghasilkan zona hambatan, yakni *Bacillus sp.* isolat Ba-1, sedangkan bakteri antagonis lainnya tidak terdeteksi adanya zona hambatan yang terbentuk. Pembentukan zona hambatan ini mengindikasikan adanya mekanisme antibiosis dari isolat *Bacillus* tersebut terhadap *R. solanacearum*, sedangkan lima isolat *Bacillus* lainnya tidak memiliki mekanisme antibiosis. Namun, zona hambatan yang dibentuk oleh isolat Ba-1 sangat kecil.

### Pengujian penekanan penyakit layu bakteri di rumah kaca

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap kemampuan bakteri antagonis dalam menghambat perkembangan penyakit layu bakteri pada beberapa varietas tomat menunjukkan hasil yang beragam. Hal ini ditunjukkan intensitas penyakit serta laju infeksi yang beragam pada varietas/kultivar yang berbeda setelah diaplikasikan bakteri antagonis (Tabel 1).

**Tabel 1.** Luas zona hambatan bakteri antagonis secara *in vitro* terhadap *R. solanacearum*

Isolat <i>Bacillus</i> sp.	Luas zona hambatan (mm)	Mekanisme hambatan
Ba-1	1,25	Bakteriostatik
Ba-3	Tt	-
Ba-4	Tt	-
Ba-9	Tt	-
Ba-11	Tt	-
Ba-16	Tt	-

Keterangan : (tt) = tidak terdeteksi adanya zona hambatan

**Tabel 1.** Intensitas penyakit pada 30 hsi dan laju perkembangan penyakit layu bakteri pada beberapa varietas tomat setelah diinokulasikan *R. solanacearum* setelah diaplikasikan bakteri antagonis secara tunggal

Aplikasi Isolat <i>Bacillus</i>	Intensitas Penyakit Layu Bakteri (%)				Laju Perkembangan Penyakit (unit/hari)			
	Melinda	Permata	Tombatu	King Kong	Melinda	Permata	Tombatu	King Kong
Ba-1	28.89 a	31.11 a	0.00 a	44.44 ab	0.014 a	0.016 a	0.000 a	0.025 a
Ba-3	33.33 a	66.67 a	44.44 a	90.00 b	0.114 a	0.132 a	0.119 a	0.242 bc
Ba-4	33.33 a	64.44 a	44.44 a	11.11 a	0.114 a	0.130 a	0.119 a	0.005 a
Ba-9	66.67 a	55.56 a	22.22 a	44.44 ab	0.227 a	0.032 a	0.014 a	0.119 ab
Ba-11	95.56 a	51.11 a	11.11 a	27.78 ab	0.252 a	0.038 a	0.005 a	0.014 a
Ba-16	66.67 a	88.89 a	22.22 a	44.44 ab	0.227 a	0.241 a	0.014 a	0.027 a
Kontrol	88.89 a	55.56 a	44.44 a	100.00 b	0.241 a	0.127 a	0.022 a	0.341 c

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang tidak sama adalah berbeda nyata menurut uji DMRT pada taraf 5% setelah data ditransformasi ke dalam  $\sqrt{y + 1/2}$ . Keterangan : Ba-1, 3, 4, 9, 11 dan 16 = isolat *Bacillus* spp.; Kontrol = tanpa *Bacillus* spp.

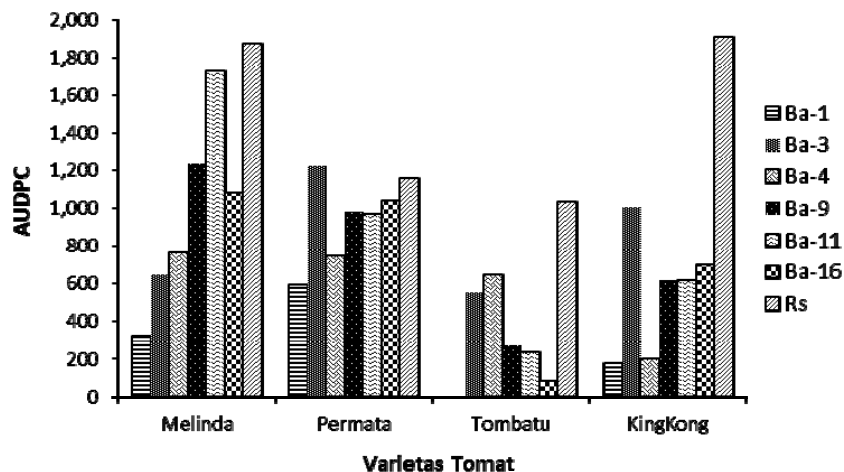
**Tabel 2.** Sifat fisiologis dan biokimia dari bakteri antagonis yang digunakan

Parameter Pengujian	<i>Bacillus</i> spp.				Ba-11	Ba-16	<i>B. subtilis</i> <sup>a</sup>	<i>B. licheniformis</i> <sup>b</sup>
	Ba-1	Ba-3	Ba-4	Ba-9				
<b>Uji fisiologis dan biokimia:</b>								
Uji gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidatif/fermentatif	F	F	F	F	F	F	tt	+
Hidrolisis gelatin	-	-	-	-	-	-	tt	tt
Hidrolisis pati	+	+	tt	+	tt	tt	+	+
Pembentukan levan	+	+	+	+	+	+	tt	tt
Uji <i>Voges Praskauer</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginin dehidrolase	+	+	+	+	+	+	-	+
Motilitas	+	+	+	+	+	+	+	+
Pertumbuhan pada:								
NaCl 1,0%	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 2,0%	+	+	+	+	+	+	+	+
Suhu 40°C	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5,7	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Penggunaan dan perombakan senyawa karbon:</b>								
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Dekstroza	+	+	+	+	+	+	tt	tt
Selobiosa	+	+	+	+	+	+	L	tt
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	tt
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	L	+
Penggunaan sitrat	-	+	+	-	-	-	+	+
<b>Perombakan senyawa nitrogen:</b>								
Reduksi nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+

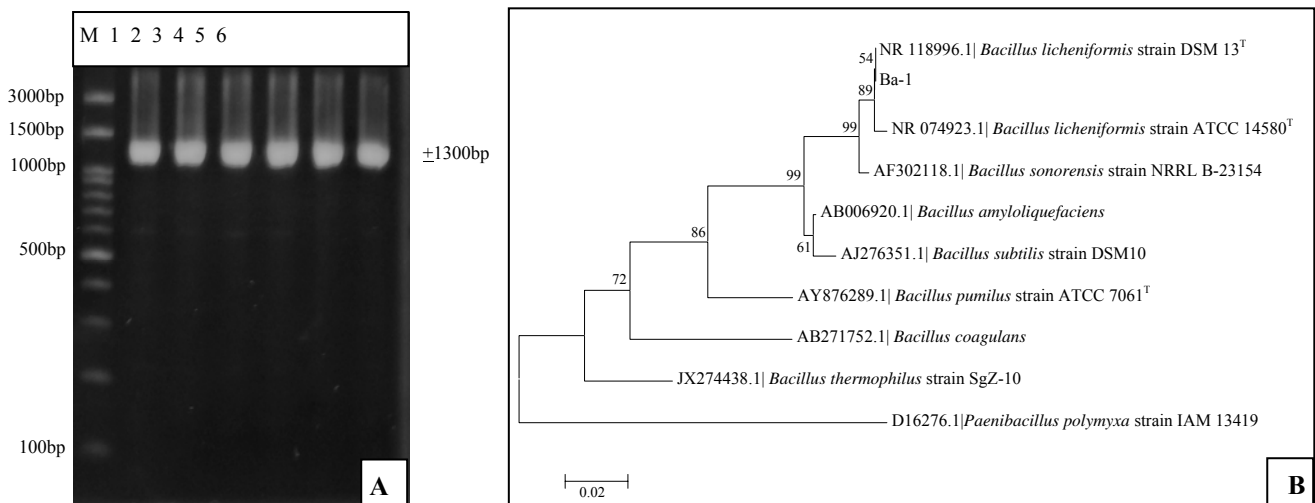
Keterangan: +: bereaksi positif atau ada pertumbuhan bakteri; -: reaksi negative atau tidak ada pertumbuhan bakteri; L: bereaksi lemah; tt: tidak terdeteksi; a: Ashiru et al. (2012); b: O'Donnell et al. (1980)

Data pada Tabel 1 memperlihatkan *Bacillus* sp. isolat Ba-1 cenderung menunjukkan kemampuan yang lebih baik dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri pada empat varietas tomat yang digunakan dibandingkan dengan isolat lainnya dan tanpa pemberian *Bacillus*. Hal tersebut dilihat dari kecilnya indeks penyakit layu bakteri dan nilai

laju perkembangan penyakit layu bakteri. Selain itu, *Bacillus* sp. isolat Ba-3 memiliki nilai AUDPC yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan isolat *Bacillus* lainnya dan kontrol positif (Gambar 1). Nilai AUDPC pada percobaan ini mencerminkan keefektifan suatu perlakuan dalam menekan patogen.



Gambar 1. Nilai AUDPC dari penyakit layu bakteri pada beberapa tomat varietas setelah diberi *Bacillus* spp.



Gambar 2. A. Hasil visualisasi ke-enam isolat *Bacillus* pada gel Agarose dengan ukuran target  $\pm 1300$  bp (M = Marker 100bp; 1-6 = *Bacillus* sp. isolat Ba-1, Ba-3, Ba-4, Ba-9, Ba-11 dan Ba-16 ). B. Pohon filogenetik dari *Bacillus* sp. isolat Ba-1 dan kerabat terdekat dari spesies Genus *Bacillus* lainnya berdasarkan sekuen gen 16S rRNA. Nilai *bootstrap* ditunjukkan pada setiap *node*. *Paenibacillus polymyxa* IAM 13419 digunakan sebagai *outgroup* dari sekuen. Keterangan : T = *Type strain*.

**Identifikasi *Bacillus* spp.**

Hasil identifikasi sifat fisiologis dan biokimia dari keenam isolat *Bacillus* spp. yang digunakan menunjukkan hasil yang hampir seragam. Hanya dibebberapa pengujian yang terlihat perbedaan.. Dari hasil pengujian ini, terlihat keenam isolat *Bacillus* yang digunakan memiliki kesamaan sifat lebih dekat dengan *B. licheniformis* dibandingkan dengan *B. subtilis*. Sifat fisiologis dan biokimia dari keenam isolat *Bacillus* spp. disajikan pada Tabel 2

Uji sifat genetik bakteri antagonis dilakukan secara molekuler dilakukan dengan menggunakan teknik PCR dengan menggunakan primer universal 63F dan 1378R untuk keseluruhan bakteri antagonis yang digunakan. Hasil visualisasi amplifikasi dari keseluruhan isolat *Bacillus* spp. yang digunakan menunjukkan pita DNA sejajar pada ukuran  $\pm 1300$ bp (Gambar 2.A). Visualisasi dilakukan

dengan menggunakan gel agarosa 1,5% dan diamati di bawah UV *transiluminator*. Identifikasi dilanjutkan dengan melakukan sekuensing. Sekuensing dilakukan berdasarkan sekuen gen 16S rRNA yang kemudian urutan basa DNA tersebut diperlukan untuk mengetahui kekerabatan isolat yang diidentifikasi dengan *database* yang ada di *GeneBank* NCBI dengan menggunakan program *BLAST*.

Homologi isolat Ba-1 berdasarkan gen 16S rRNA dari hasil *BLAST* didapatkan bakteri ini berkerabat dekat dengan beberapa strain dari *Bacillus licheniformis* dengan homologi mencapai 99%, yakni *B. licheniformis* strain ATCC 14580<sup>T</sup> (NR 074923) dan *B. licheniformis* strain DSM 13<sup>T</sup> (NR 118996). Selain itu, isolate Ba-1 juga memiliki kesamaan dengan *Bacillus sonorensis* strain NRRL B-23154 (AF302118). Berdasarkan hasil *BLAST* tersebut, kemudian dibuat pohon filogenetik yang disusun

dengan metode *neighbour-joining algortm*. Kekekabatan *Bacillus* sp. isolat Ba-1 terlihat pada Gambar 2.B. Pada pohon filogenetik terlihat isolat Ba-1 memiliki hubungan kekerabatan dengan *B. licheniformis* strain DSM 13<sup>T</sup> (NR 118996) dari *database GeneBank* dengan nilai *bootstrap* 54 dalam 1.000 kali ulangan.

## Pembahasan

Perbedaan zona hambatan pada isolat-isolat *Bacillus* sp. diduga dikarenakan kondisi dan kandungan nutrisi pada media yang digunakan. Hal tersebut memungkinkan bakteri tidak dapat menghasilkan senyawa antibiosis. *Bacillus* spp. telah diketahui sebagai bakteri-bakteri yang mampu menghasilkan senyawa antibiosis yang beragam. Tidak terbentuknya zona hambatan yang dikarenakan kondisi media tumbuh yang digunakan juga telah dilaporkan oleh Moore et al. (2013), dimana pada penelitian tersebut tujuh strain *Bacillus* yang digunakan tidak memperlihatkan adanya zona hambatan terhadap enam bakteri patogen pada tiga jenis media (NZY agar, NA (Nutrient Agar) dan TSA (Trypticase Soy Agar) dari empat jenis media yang digunakan. Al-Zahrani (2007) menjelaskan bahwa senyawa antibiosis sangat dipengaruhi oleh komposisi medium, baik secara kuantitatif maupun kualitatif.

Kecil atau tidak adanya zona hambatan dari hampir keseluruhan *Bacillus* spp. ini tidak berarti bakteri tersebut tidak mampu menekan penyakit layu bakteri. Hal ini terlihat dari beberapa isolatnya dapat menunjukkan kemampuan penghambatan yang baik pada pengujian di rumah kaca. Penghambatan terbaik ditunjukkan oleh isolat Ba-1 dibandingkan dengan isolat lainnya dan kontrol positif yang terlihat dari kecilnya indeks penyakit, nilai laju ineksi dan AUDPC. Semakin rendah angka AUDPC semakin efektif perlakuan tersebut mengendalikan patogen (Hanudin et al. 2011). Dengan demikian, diduga mekanisme yang berperan dalam menekan penyakit layu bakteri oleh *Bacillus* sp. isolat Ba-1 ini dalam bentuk kompetisi baik ruang maupun nutrisi, mengeluarkan enzim pendegradasi atau dapat pula melalui mekanisme ketahanan terimbas (Lo 1998). Menurut Arwiyanto dan Hartana (1999), perendaman akar tembakau dalam suspensi *Bacillus* sp (10<sup>8</sup>cfu/mL) selama 30 menit dapat menekan perkembangan penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*. Selanjutnya Arwiyanto et al. (2007) melaporkan pula bahwa penggunaan *Bacillus* spp. mampu menekan penyakit lincat yang disebabkan oleh infeksi ganda *R. solanacearum* dan nematoda *Meloidogyne incognita* pada tembakau Temanggung sehingga intensitas penyakitnya hanya sebesar 23,3% sedangkan pada kontrol sebesar 63%.

Berdasarkan hasil pengujian secara fisiologi dan biokimia maupun molekuler, *Bacillus* sp. isolat Ba-1 ini memiliki kekerabatan yang erat dengan *Bacillus licheniformis* strain DSM 13<sup>T</sup>. Pinto (2012) menyatakan bahwa *B. licheniformis* mampu mendegradasi beberapa substrat dan mampu menghasilkan enzim-enzim hidrolitik. Selain itu, Gomaa (2013) mendapatkan pula *B. licheniformis* strain M104 yang mampu menghasilkan biosurfaktan yang bersifat antimikrobia dan berpotensi besar untuk aplikasi di bidang bioteknologi dan biofarmasi

karena sifat biologisnya. Masih sedikit informasi yang menunjukkan pemanfaatan *B. licheniformis* dalam menekan bakteri patogen tumbuhan, namun *B. licheniformis* telah digunakan dalam menekan jamur patogen tumbuhan, seperti *Botrytis cinerea* pada tomat (Lee et al. 2006) dan terhadap *Sclerotinia homoeocarpa* dengan *B. licheniformis* yang telah diformulasikan dengan nama produk *EcoGuard* (Schisler 2004).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh Direktorat Jendral Perguruan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia dengan suratperjanjian Nomor 108/SP2H/PL/Dit.litabmas/IV/2004 tanggal 30 April 2014. Penulis mengucapkan banyak terima kasih.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Zahrani SHM. 2007. Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolat from Jazan. *JKAU Sci* 19:127-138.
- Arwiyanto T, Hartana I. 1999. Pengendalian hayati penyakit layu bakteri tembakau, percobaan rumah kaca. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 5: 50-59.
- Arwiyanto T, Asfanudin R, Wibowo A, Martoredjo T, Dalmadiyo G. 2007. Penggunaan *Bacillus* isolat lokal untuk menekan penyakit lincat tembakau Temanggung. *Berkala Penelitian Hayati* 13: 79-84.
- Arwiyanto T. 1997. Pengendalian hayati penyakit layu bakteri tembakau. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 5: 54-60.
- Berlian I. 2012. Analisis petogenesitas dan karakterisasi keragaman genetik *Banana Blood Disease Bacterium* (BDB). [Tesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Boukaew S, Chuenchit S, Petcharat V. 2011. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of sclerotium root and stem rot and ralstonia wilt of chili pepper. *BioControl* 56: 365-374.
- Chun W, Vidaver AK. 2001. Gram positive bacteria: *Bacillus*. In: Schaad NW, Jones JB, Chun W (eds). *Plant Pathogenic Bacteria* 3<sup>rd</sup>ed. APS Press, Minnesota.
- Dong C, Zeng X, Liu Q. 1999. Biological control of tomato bacterial wilt with avirulent bacteria carcinogenic strain of *Ralstonia solanacearum*. *J Sci China Agric Univ* 20: 1-4.
- Elphinstone JG. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC. *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*. APS Press, Minnesota.
- Gomaa EZ. 2013. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Braz Arch Biol Technol* 56: 259-268.
- Hanudin, Marwoto B, Hersanti, Muharam A. 2012. Kompatibilitas *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Trichoderma harzianum* untuk mengendalikan *Ralstonia solanacearum* pada tanaman kentang. *J Hort* 22: 173-80.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Rev Phytopathol* 29: 65-87.
- Jeger M, Viljanen-Rollinson S. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor Appl Genet* 102, 32-40.
- Lee SW, Kim CS, Son JH, Song JH, Lee KY, Kim HJ, Jung SJ, Moon BJ. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 37, 329-337
- Lelliot RA, Stead DE. 1987. *Methodes for the diagnosis of bacterial diseases of plant*. British Society for Plant Pathology by Blackwell Sscientific Publication. Melbourne.
- Lo CT. 1998. General mechanism of action of microbial biocontrol agents. *Plant Pathol Bull* 7: 155-156.

- Maji S, Chakrabarty PK. 2014. Biocontrol of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* by isolates of plant growth promoting rhizobacteria. *Australian J Crop Sci* 8: 208-214.
- Moore T, Globa L, Barbaree J, Vodyanoy V, Sorokulova I. 2013. Antagonistic activity of Bacillus bacteria against food-borne pathogens. *J Prob Health* 1: 110.
- O'donnell G, Norris JR, Berkeley RCW, Claus D, Kaneko T, Logan NA, Nozaki R. 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical test, and API system. *Intl J Syst Bacteriol* 30: 448-459.
- Pinto C. 2012. Physiological characterization of a *Bacillus licheniformis* strain in chemostat cultivations. <http://www.chemeng.lth.se/exjobb/E661.pdf> [26 April 2015]
- Schisler DA, Slininger PJ, Behle RW, Jackson MA. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. *Phytopathology* 94: 1267-1271.
- Semangun H. 2006. Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Srinivasan R. (Ed.). 2010. Safer tomato production methods: A field guide for soil fertility and pest management, Taiwan: AVRDC - The World Vegetable Center. AVRDC Publication No. 10: hal. 740. 97.
- Van der Plank JE. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York.
- Vanitha S, Niranjana S, Mortensen C, Umesha S. 2009. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. *BioControl* 54: 685-695.
- Wei Z, Yang X, Yin S, Shen Q, Ran W, Xu Y. 2011. Efficacy of Bacillus-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Appl Soil Ecol* 48: 152-159.
- Williams TS, Goodfellow M, Alderson G. 1989. *Genus Streptomyces* Warkman and Henrici, In: Williams ME, Holt JG. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, London.
- Xue Q, Chen Y, Li S, Chen L, Ding G, Guo D, Guo J. 2009. Evaluation of the strains of Acinetobacter and Enterobacter as potential biocontrol agents against Ralstonia wilt of tomato. *Biol Control* 48:252-258.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. 1995 Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to Ralstonia Genus nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb.nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol* 39: 897.