

EKSPLORASI BAKTERI *Bacillus* spp. PADA PERAKARAN TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) SEBAGAI AGENSIA PENGENDALI HAYATI PATOGEN *Fusarium* sp. ASAL LAHAN WONOKITRI KABUPATEN PASURUAN JAWA TIMUR

EXPLORATION OF BACTERIA *Bacillus* spp. ON THE ROOTINGS OF POTATO PLANT (*Solanum tuberosum* L.) AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT FOR THE PATHOGEN *Fusarium* sp. ORIGIN OF WONOKITRI LAND, PASURUAN DISTRICT, EAST JAVA

Paisal, Endang Triwahyu, Hery Nirwanto

Program studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, UPN "Veteran" Jawa Timur

Korespondensi Autor; endang_tp@upnjatim.ac.id

ABSTRACT

The potato plant (*Solanum tuberosum* L.) is a horticultural commodity that can be used as a source of carbohydrates and has the potential to fulfill food needs. Plant pest organisms that are often found in potato plants are soil-borne pathogenic fungi with an attack intensity of 50% so they can cause crop yield losses of up to 100%. Controlling soil-borne pathogens of potato plants can use the biological agent *Bacillus* sp. One of the ingredients is an extracellular enzyme based on the abilities of *Bacillus* sp. So this research aims to determine the effect of *Bacillus* sp. can inhibit the growth of *Fusarium* wilt disease. *Bacillus* sp. The bacteria used in this research were exploration bacteria from Wonokitri land, Pasuruan Regency, East Java, namely isolate I17. The method for carrying out this research is taking potato plant soil samples, isolation, rejuvenation of *Bacillus* sp. bacteria, 3% KOH test, catalase test, pathogenicity test, gram *Bacillus* staining, antagonist test. Observation of the morphology of *Fusarium* sp. post in vitro antagonist test. Isolate I17 produced *Fusarium* hyphae morphology that experienced abnormal development, namely bending, shrinking, lysis, twisting and curling. The research was carried out from December 2022 to April 2023 in the Health Laboratory, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Veterans National Development University, East Java.

Key words: Potato Plants, *Fusarium* sp, *Bacillus* sp

INTISARI

Tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang dapat dipakai sebagai sumber karbohidrat dan berpotensi untuk pemenuhan kebutuhan pangan. Organisme pengganggu tanaman yang sering ditemukan pada tanaman kentang adalah jamur patogen tular tanah dengan intensitas serangan 50% sehingga dapat menimbulkan kerugian hasil panen hingga 100%. Pengendalian patogen tular tanah tanaman kentang dapat menggunakan agensia hayati *Bacillus* sp. Yang salah satu kandungannya adalah enzim ekstraseluler berdasarkan kemampuan yang dimiliki *Bacillus* sp. Maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *Bacillus* sp. dapat menghambat pertumbuhan penyakit layu fusarium. Bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri eksplorasi dari lahan wonokitri Kabupaten Pasuruan Jawa Timur yaitu isolat I17. Metode pelaksanaan penelitian ini yaitu pengambilan sampel tanah tanaman kentang, isolasi, peremajaan bakteri *Bacillus* sp., uji KOH 3%, uji katalase, uji patogenesis, pewarnaan gram *Bacillus*, uji antagonis. Pengamatan morfologi *Fusarium* sp. pasca uji antagonis in vitro. Isolat I17 menghasilkan morfologi hifa *Fusarium* mengalami perkembangan yang abnormal, yaitu membengkok, mengecil, lisis, melilit dan keriting. Penelitian dilaksanakan dari bulan Desember 2022 sampai bulan April 2023 di laboratorium Kesehatan, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jawa Timur.

Kata kunci: Tanaman Kentang, *Fusarium* sp, *Bacillus* sp

PENDAHULUAN

Tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang dapat dipakai sebagai sumber karbohidrat dan berpotensi untuk pemenuhan

kebutuhan pangan. Tanaman kentang dapat dibudidayakan pada dataran menengah yaitu 300 sampai 1000 mdpl (Karjadi dan Buchory, 2008). Daerah Wonokitri, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, dengan ketinggian 1000 mdpl

menyumbang produksi kentang pada tahun 2017 sebesar 60% dengan luas lahan 3.000 ha. Namun, produktivitas kentang tersebut dinilai masih rendah yaitu 10-15 ton/ha. Hasil ini masih jauh dari produktivitas nasional yang mencapai rata-rata 25 ton/ha (Ishartati *et al.*, 2019).

Penurunan hasil produksi kentang disebabkan oleh faktor cuaca yang salah satunya adalah suhu tanah $\leq 10^{\circ}\text{C}$ atau $\geq 30^{\circ}\text{C}$, tanaman kentang dapat tumbuh pada suhu optimum yakni kisaran antara 18°C sampai 20°C dengan kelembaban udara 80% sampai 90% (Kementan, 2013). Faktor lain penyebab turunnya hasil produksi kentang yaitu lahan ditanami secara terus menerus dan benih tanaman kentang yang tidak bersertifikat sehingga menghasilkan kualitasnya rendah. Direktorat Jenderal Hortikultura (2010) melaporkan bahwa pada tahun 2008 petani membutuhkan bibit kentang sebesar 96.227 ton, sedangkan ketersediaan bibit dalam Negeri yang terdaftar bersertifikat hanya sebesar 8.066 ton (8,3%).

Organisme pengganggu tanaman yang sering ditemukan pada tanaman kentang adalah jamur patogen tular tanah dengan intensitas serangan 50% sehingga dapat menimbulkan kerugian hasil panen hingga 100% (Yulipriyanto, 2010). Salah satu jamur patogen tular tanah yang sering menyerang tanaman kentang adalah *Fusarium* sp. penyebab penyakit layu *Fusarium* pada tanaman kentang. Penyakit ini menyerang akar melalui luka pada tanaman. Batang tanaman yang terserang penyakit layu *Fusarium* akan tetap keras dan hijau pada bagian luar, tetapi pada jaringan vaskular akan terjadi diskolorisasi berupa luka sempit berwarna coklat (Yuniarti, 2010). *Fusarium* sp. dapat bertahan dalam tanah lebih dari 10 tahun dengan membentuk klamidospora (Semangun, 2001).

Jamur *Fusarium* sp. dapat menyebar melalui menginfeksi akar tanaman berupa miselium (Semangun, 2005). Gejala infeksi *Fusarium* sp. pada persemaian akan menyebabkan tunas layu kemudian mati. Tanaman dewasa pertulangan daun bagian atas

tanaman akan memucat dan daun di bagian bawah menguning kemudian diikuti ujung daun menggulung ke arah bawah hingga tanaman mati. Gejala layu *Fusarium* dimulai dari bagian bawah tanaman hingga merambat ke atas. Apabila dilihat dari penampang melintang, batang utama mengalami perubahan warna kecoklatan pada jaringan vaskuler (Raharjo, 2017).

Surono dan Hendra (2013) menyatakan bahwa bakteri agensia hayati bisa menekan pertumbuhan patogen dalam tanah secara alamiah. Beberapa genus bakteri agensia hayati yang telah dapat mengendalikan patogen tanaman yaitu *Agrobacterium*, *Bacillus* dan *Pseudomonas*. *Bacillus* sp. merupakan bakteri antagonis yang dikenal sebagai agensia hayati penghasil antibiotik seperti basitrasin yang beracun bagi patogen.

Bacillus spp. dapat menghasilkan fitohormon yang mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman dan berperan sebagai fasilitator penyerapan beberapa unsur hara dari lingkungan (Prasetyawati *et al.*, 2021). Selanjutnya, *Bacillus* spp. mempengaruhi pertumbuhan tanaman dalam dua cara yang berbeda, yaitu secara langsung dan tidak langsung. Secara langsung rhizobakteri menyediakan senyawa yang disintesis langsung oleh *Bacillus* sp. misalnya fitohormon atau memfasilitasi penyerapan nutrisi tertentu dari lingkungan. Pengaruh secara tidak langsung atau ketahanan yang terimbas sebagai pengaruh induksi ketahanan dicirikan dengan adanya akumulasi asam salsilat dan patogenis related-protein (pr-protein) Chen *et al.*, 2000)

Bacillus sp. Terdapat banyak pada perakaran tanaman sehat yang mampu menunjang pertumbuhan tanaman dan berperan sebagai antagonis bagi patogen tanaman. Salah satu genus bakteri yang paling banyak ditemui daerah perakaran tanaman. Penelitian Prihartiningsih *et al.*, (2015) berhasil mengisolasi *Bacillus subtilis* B315 dan rhizosfer kentang dalam menekan patogen *Ralstonia solanacearum*. Abidin *et al.*, (2015) menambahkan isolat bakteri anggota spesies *Bacillus* sp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman

cabai, mampu menghambat pertumbuhan jamur anggota spesies *Colletotrichum capsici* tingkat >40% dan anggota spesies *Fusarium oxysporum* tingkat >20% serta jamur anggota spesies *Sclerotium rolfsii* Sacc. dengan tingkat 52,8% pada tanaman kedelai.

Berdasarkan penelitian potensi *Bacillus* spp. sebagai agensia hayati pada famili tanaman Solanaceae, maka perlu dilakukan penelitian pada jenis tanaman lain yang masih satu famili. Diantaranya tanaman kentang yang juga dapat terserang jamur *Fusarium*. Penelitian potensi *Bacillus* spp. pada tanaman kentang masih belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan eksplorasi bakteri *Bacillus* spp. sebagai agensia hayati pada tanaman kentang.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya; cawan petri, tabung reaksi, autoklaf, vortex, orbital shaker, Laminar Air Flow (LAF), alat sentrifugasi, mikropipet, gelas beaker, gelas ukur erlenmeyer, pengaduk kaca, jarum suntik, lampu bunsen, timbangan analitik, cetok, batang T, batang L, skalpel.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya; tanah rizosfer, media Potato Dextrose Agar (PDA), media Nutrient Agar (NA), media Nutrient Broth (NB), kloroform, pepton, aquades steril, kapas, plastik, tissue, label, alkohol 70%, kertas saring, spiritus, tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.).

Pelaksanaan Penelitian

Pengambilan Sampel Tanah

Bahan yang digunakan untuk isolasi adalah sampel tanah dari rhizosfer tanaman kentang dengan kedalaman 5-10 cm dari permukaan tanah di desa wonokriti, Kabupaten Pasuruan Jawa Timur.

Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan bertujuan untuk menghilangkan semua jenis mikroorganisme yang hidup terdapat suatu benda. Sterilisasi diawali dengan mencuci alat yang digunakan

hingga bersih dan dikeringkan. Metode sterilisasi basah dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm, selama 20 menit (Sari dan Abdul, 2012)

Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media PDA (Potato Dextrosa Agar) dan media NA (Nutrient Agar). Melarutkan 39 gram media PDA, 20 gram media NA dan mencampurkan ke masing masing beaker glas yang berisi aquades 1000 ml. memanaskan media di atas *hot plate* dan *stirrer* sehingga homogen dan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm, selama 15 menit (Handayani, 2015)

Pembuatan Media Nutrient Broth

Alat digunakan harus disterilkan terlebih dahulu agar terhindar dari kontaminasi. Media cair dibuat dengan cara timbang NB sebanyak 1 gram dalam 125 ml aquades steril, panaskan sampai mendidih kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (Melnick, 2008). menghilangkan semua jenis mikroorganisme yang hidup

Isolasi dan Pemurnian Jamur *Fusarium* sp.

Daun tanaman kentang yang terinfeksi penyakit layu *fusarium* akan layu dan mengering, tetapi tetap menempel pada tanaman. Kelayuan akan berlanjut ke bagian daun yang lebih muda dan tanaman akan segera mati. Batang tanaman akan tetap keras dan hijau pada bagian luar, tetapi pada jaringan vaskular tanaman terjadi perubahan warna, seperti luka sempit berwarna coklat. Perubahan warna dapat dilihat dengan mudah dengan cara memotong batang tanaman yang terdekat dari perakaran atau tanah dan akan terlihat luka sempit berbentuk cincin berwarna coklat, diantara daerah sumbu tanaman dan bagian terluar batang Masnilah (2020).

Isolasi patogen dari jaringan tanaman mengikuti metode Koyyappurath *et al.*, (2015). Batang tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) yang menunjukkan gejala terinfeksi dicuci

bersih dengan air mengalir kemudian dipotong melintang di antara bagian yang sehat dengan yang sakit dengan ukuran sekitar 1x1 cm. Setiap potongan dicelupkan pada alkohol 70% kemudian bilas dengan air steril 3 kali. Sebanyak 3-4 potongan batang diletakkan pada media PDA dalam cawan petri. Potongan batang diinkubasi dalam media PDA pada suhu ruang selama 4-5 hari. Setelah tumbuh jamur patogen, dimurnikan dengan mengambil ujung hifa dari jamur patogen kemudian dipindahkan pada media PDA baru.

Isolasi dan Pemurnian Isolat Bakteri *Bacillus* sp.

Proses isolasi dilakukan dengan cara mengambil 10 gram sampel tanah dan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer 150 ml steril dan di-shaker selama 30 menit dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya dipanaskan diatas hot plate pada suhu 80°C selama 15 menit, dan dilakukan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} diambil sebanyak 100 ppm lalu ditumbuhkan pada cawan petri berisi medium NA (Singh *et al.*, 2012).

Uji Katalase

Cara kerja dari uji katalase yaitu dilakukan diatas kaca preparat dengan cara satu tetes H₂O₂ 3% dicampurkan dengan isolat bakteri. Hasil uji katalase positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara setelah bakteri ditetesi larutan H₂O₂ (katalase +) (Handayani *et al.*, 2013).

Uji Gram Bakteri

Uji Gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri Gram positif atau kelompok bakteri Gram negatif. Uji Gram dengan KOH ini dilakukan dengan mengambil 1-2 ose bakteri yang berumur 18-24 jam dan meletakkan di atas gelas preparat. kemudian isolat ditetesi KOH 3% sebanyak 1-2 tetes dan dicampur-ratakan. Setelah itu, jarum ose steril ditempelkan pada campuran tersebut dan diangkat secara perlahan. Apabila terbentuk

benang lendir yang tidak terputus, maka bakteri yang dibiakan merupakan bakteri gram negatif, namun apabila tidak terbentuk, maka bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif (Suslow *et al.*, 1982).

Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan dengan metode uji yang dikemukakan oleh Lelliot dan Stead (1987). Pembusukan dilakukan untuk membedakan isolat bakteri yang diisolasi mampu menyebabkan gejala busuk lunak pada umbi kentang. Umbi dicuci dengan air mengalir dan dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara direndam dengan larutan Nystatin 2% untuk menghindari pertumbuhan cendawan pada permukaan umbi, lalu umbi kentang dipotong persegi empat menggunakan scalpel dengan ukuran 3 cm. Koloni bakteri yang telah diperbanyak dalam media Nutrient Broth (NB), sebanyak 100 µL (10^5 cfu/ml) diinokulasikan ke permukaan umbi kentang sehat dengan cara dilukai dengan sengaja menggunakan scalpel. Sebagai perlakuan kontrol, umbi kentang dilukai dan disuntik dengan aquades steril. Pengamatan dilakukan selama 3 hari di dalam cawan steril dan diinkubasi pada suhu ruang. Reaksi positif ditunjukkan dengan terjadinya pembusukan pada bagian tengah kentang (Masnilah *et al.* 2013).

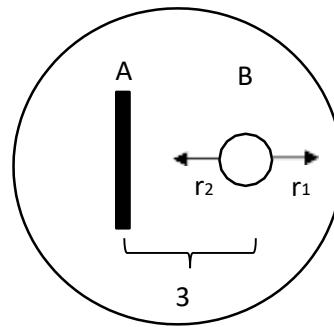
Pewarnaan Gram *Bacillus* spp.

Karakterisasi mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. menggunakan empat macam cat yakni Gram A (Kristal violet), Gram B (Iodine Lugol), Gram C (etanol 96%) dan Gram D (Safranin). Suspensi bakteri dari biakan murni bakteri berumur 24 jam. Pewarna gram A ditetaskan sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan 1 menit lalu dicuci dengan aquades mengalir. Langkah serupa diaplikasikan dengan menggunakan pewarna Gram B, Gram C dan Gram D. mengamati dengan mikroskop pada perbesaran 10 x 100 (1000x). bakteri positif akan berwarna biru keunguan sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah (Wulandari *et al.*, 2019).

Uji Antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* sp.

Pengujian bakteri *Bacillus* spp. secara in vitro menggunakan uji antagonis dilakukan dengan menumbuhkan koloni bakteri *Bacillus* spp. dan jamur *Fusarium* sp. pada media PDA dengan jarak 3 cm pengamatan daya hambat

dihitung mulai umur 1 HSI sampai 3 hari. Aktivitas antagonis diamati melalui zona hambat bakteri *Bacillus* spp. dengan jamur patogen tersebut, dan menggunakan rumus zona hambatan (Ganesan *et al.*, 2007). Untuk perlakuan kontrol yaitu menumbuhkan koloni *Fusarium* sp tanpa adanya inokulasi koloni *Bacillus* sp pada cawan petri.



Gambar 3.2. Uji antagonis secara in vitro

$$IH = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

R1 = Jari-jari koloni jamur yang menjauhi bakteri

R2 = Jari-jari koloni jamur yang mendekati bakteri

Variabel pengamatan

Daya Hambat *Bacillus* spp. secara In Vitro

Pengamatan daya hambat *Bacillus* sp. terhadap *Fusarium* sp. dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat (Zona berwarna bening) di sekitar *Fusarium oxysporum* yang ditumbuhkan pada media NA yang telah diinkubasi bakteri antagonis *Bacillus* spp. semakin besar zona hambat yang dihasilkan maka semakin besar pula kemampuan *Bacillus* spp. dalam menghambat pertumbuhan patogen *Fusarium* sp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Bakteri Antagonis (*Bacillus* sp.)

Hasil identifikasi bakteri antagonis yang ditemukan memiliki ciri-ciri pada (Tabel 1), bahwa bakteri antagonis yang ditemukan diduga sebagai bakteri kelompok *Bacillus* sp. Hal ini ditunjukkan dengan ciri-ciri koloni

Pengamatan Morfologi *Fusarium* sp. Pasca Uji Antagonis In vitro

Pengamatan morfologi *Fusarium* sp. dilakukan pasca pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian bakteri antagonis terhadap patogen. Pengaruh dilihat dari pertumbuhan miselium yang abnormal. Pengamatan dilakukan dengan mengambil miselium *Fusarium* sp. yang terletak di dekat zona hambat bakteri antagonis dan diletakkan pada preparat yang ditetesi aquades lalu ditutup dengan kaca penutup dan diamati pada mikroskop olympus.

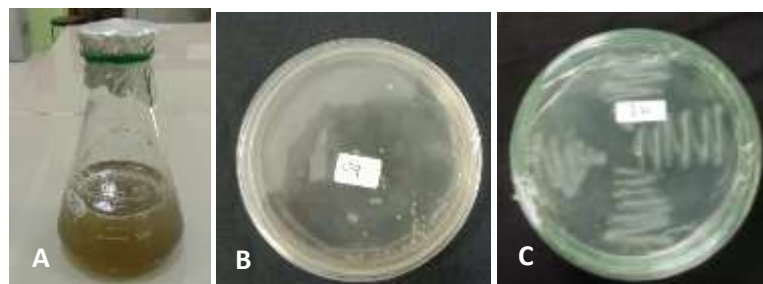
bakteri circular (bulat) dan punctiform (bulat kecil), variasi margin dan entire (halus) dan lobate (berombak atau bergerigi), berwarna putih kusam, tidak berlendir bakteri gram positif, mempunyai endospora dan sebagian bersifat motil (mampu bergerak). Hal ini sesuai penelitian Supriadi (2006), *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif, berwarna

putih, berflagel tidak berlendir, dan mempunyai bentuk tepi bergerigi. Pernyataan tersebut diperkuat oleh Aini *et al.*, (2013) bahwa *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif, berflagel, dan memiliki endospora.

Endospora merupakan struktur dengan dinding yang tebal dan lapisan tambahan pada sel bakteri yang dibentuk di bagian dalam membran sel. Endospora terbentuk apabila bakteri berada dalam kondisi yang ekstrim atau

tidak menguntungkan bagi pertumbuhannya. Endospora merupakan ciri utama spesies *bacillus* sp. sehingga dapat digunakan untuk membedakan dari kelompok bakteri lain.

Endospora memiliki kemampuan resistensi terhadap bahan kimia yang terdapat di alam, tahan terhadap panas ekstrem, kondisi kurang air, dan radiasi (Astuti 2008). Morfologi koloni *bacillus* sp. berdasarkan hasil pengamatan pada mikroskop cahaya



Gambar. (A) Jari-jari yang mendekati *Bacillus* spp, (B) Jari-jari yang menjauhi bakteri *Bacillus* sp., (C) Daya Hambat Uji Antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* spp. (D) Tidak terjadi daya hambat uji Antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* spp.

Uji KOH 3%

Hasil pengujian reaksi gram mikroorganisme bakteri antagonis dari

rhizosfer tanaman kentang menggunakan KOH 3% dapat dilihat pada tabel

Metode/ jenis penanaman	Uji reaksi gram KOH 3%								
	i1 (+)	i2 (-)	i3 (-)	i4 (+)	i5 (-)	i6 (-)	i7 (+)	i8 (+)	i9 (-)
Gores	i10 (-)	i11 (-)	i12 (-)	i13 (+)	i14 (+)	i15 (+)	i16 (-)	i17 (+)	i18 (-)
	i19 (+)	i20 (+)	i21 (+)	i22 (+)	i23 (+)	i24 (+)	i25 (+)	i26 (+)	i27 (+)
	i28 (+)	i29 (+)	i30 (+)	i31 (-)	i32 (-)	i33 (-)	i34 (-)	i35 (-)	i36 (-)
	i37 (-)								

Berdasarkan 37 isolat pada tabel yang diuji reaksi gram menunjukkan 19 isolat tidak menghasilkan lendir pada saat pengujian reaksi gram menggunakan KOH 3%, namun isolat sejumlah 18 menghasilkan lendir. Terbentuknya lendir tersebut dikarenakan pecahnya dinding sel bakteri akibat berada

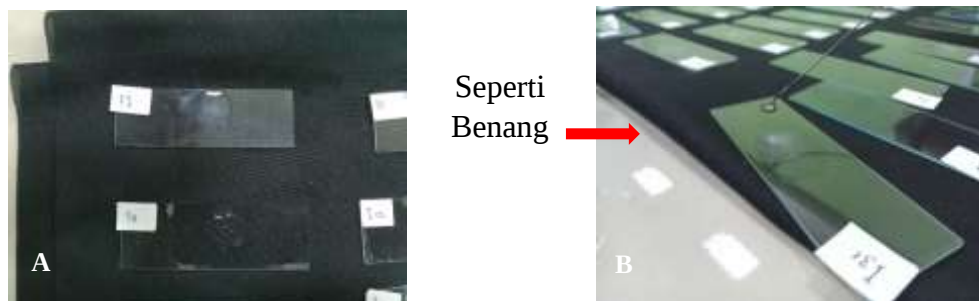
dalam larutan alkali tinggi ketika diberikan KOH 3%.

Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Soekirno (2008) yang menyatakan bahwa reaksi gram dapat di konfirmasi dengan uji kelarutan kalium hidroksida (kori) dengan mengambil satu ose penuh kultur bakteri yang

sedang tumbuh aktif dan dicampurkan dengan setetes larutan KOH 3% di atas kaca objek yang bersih kemudian dilakukan pengadukan hingga diperoleh suspensi yang rata.

Gram negatif akan membentuk lendir saat uji menggunakan KOH 3% karena

pecahnya dinding sel bakteri akibat berada dalam larutan alkali tinggi (KOH 3%). Sedangkan bakteri gram positif tidak membentuk lendir karena dinding sel bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal



Gambar. Uji KOH pada Isolat *Bacillus* spp. (A). Uji KOH pada Bakteri Gram Positif, (B). Uji KOH Pada Bakteri Negatif.

Pengamatan penanaman bakteri menunjukkan hasil identifikasi bakteri menggunakan uji gram KOH 3% yang tidak berlendir sejumlah 18 dan yang menghasilkan lendir sejumlah 19. Sehingga rata-rata bakteri growth promoting rhizobacteria tanaman kentang memiliki lendir/gram negatif, Seperti Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*), *Pseudomonas*, dll Tes string KOH cepat dan dapat membedakan bakteri menjadi Gram positif dan Gram negatif. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari lapisan peptidoglikan (90%),

sedangkan bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipid yang tinggi pada dinding selnya dalam bentuk liposakarida dan lipoprotein (Aminulloh, 2011; Kurnia *et al.*,

2015). Pada bakteri Gram negatif, dinding sel hanya setebal 1-3 lapis. Pada hadapan kalium hidroksida, dinding sel Gram negatif mudah terganggu, melepaskan bahan kromosom viskid, yang menyebabkan suspensi bakteri menjadi tebal dan berserat dinding sel bakteri gram positif tidak terpengaruh oleh 3% KOH (Madigan *et al.*, 2012; Kurnia *et al.*, 2015). “Sampel tidak memiliki lendir yang bersifat gram positif dalam uji KOH 3% berpengaruh optimum dalam mendeteksi mikroorganisme khususnya dalam mengidentifikasi *plant growth promoting rhizobacteria*.”

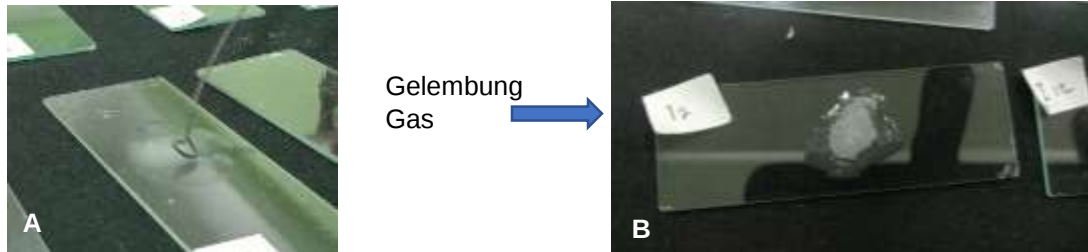
Uji Katalase

Hasil pengujian reaksi gram mikroorganisme *plant growth promoting rhizobacteria* dari rhizosfer tanaman kentang

Metode/ jenis penanaman		Uji Katalase						
Gores	I1 (+)	I2 (+)	I3 (+)	I4 (+)	I5 (+)	I6 (-)	I7 (+)	I8 (+)
	I9 (+)	I10 (+)	I11 (+)	I12 (+)	I13 (+)	I14 (+)	I15 (+)	I16 (+)
	I17 (+)	I18 (-)	I19 (+)	I20 (+)	I21 (+)	I22 (+)	I23 (+)	I24 (+)
	I25 (+)	I26 (+)	I27 (+)	I28 (+)	I29 (+)	I30 (+)	I31 (+)	I32 (+)
	I33 (+)	I34 (+)	I35 (+)	I36 (+)	I37 (+)			

Keterangan :Tanda plus (+) diberikan apabila terdapat lendir dan tanda minus (-) diberikan apabila tidak terdapat lendir pada saat ujian.

Berdasarkan 37 isolat dalam hasil uji katalase yaitu ada 33 isolat bakteri menghasilkan gelembung setelah ditetaskan H_2O_2 konsentrasi 3%, gelembung tersebut dapat dilihat secara langsung dengan mata telanjang hal ini karena jumlah gelembungnya sangat banyak dan menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menghasilkan enzim katalase



Gambar. Uji Katalase (A) Katalase Positif, (B) Uji Katalase Negatif

Kebanyakan bakteri memproduksi enzim katalase untuk pertumbuhan aerobik karena akan memecah H_2O_2 yang bersifat racun terhadap sel mikroba (Hidayat dan Alhadi, 2012). Senyawa tersebut bersifat toksik terhadap sel karena mampu menginaktivasi enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob harus menguraikan bahan toksik tersebut.

Mekanisme enzim katalase dalam memecah H_2O_2 adalah saat melakukan respirasi, bakteri menghasilkan berbagai macam komponen salah satunya H_2O_2 . Bakteri yang memiliki kemampuan memecah H_2O_2 dengan enzim katalase akan segera membentuk suatu sistem pertahanan dari toksik H_2O_2 yang dihasilkannya sendiri. Bakteri akan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 dimana parameter yang menunjukkan adanya aktivitas katalase tersebut adanya gelembung-gelembung gas seperti pada percobaan yang telah dilakukan. Hal tersebut berbeda dengan bakteri tanpa enzim katalase, sehingga pada saat terjadi metabolisme anaerob, bakteri tidak akan menghasilkan oksigen (Hidayat dan Alhadi, 2012).

yang dapat memecahkan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen (Huda & Salni, 2012). Bakteri katalase negatif sejumlah 4 tidak menghasilkan gelembung O_2 pada saat dilihat dengan mata telanjang. Hal ini berarti H_2O_2 yang diberikan tidak dipecah oleh enzim katalase.

Uji Patogenisitas

Isolat yang sudah dilakukan uji KOH 3% dan uji katalase kemudian dilanjutkan dengan uji Patogenisitas dengan tujuan untuk mengetahui gejala penyakit busuk lunak pada umbi kentang yang disebabkan oleh patogen. Fanani *et al.* (2015) menyebutkan tujuan uji patogenisitas adalah untuk membuktikan bahwa isolat yang didapatkan bisa menimbulkan gejala yang sama dengan gejala penyakit yang ditemukan sebelumnya.

Berdasarkan hasil test tring dari hasil uji koh 3% dan uji katalase sejumlah 18 akan dilanjutkan ke tahap uji Patogenisitas.

Tabel Hasil Pengamatan Uji Patogenisitas

Hari Pertama		Hari Ke Dua		Hari Ke Tiga	
i1	Tidak Bergejala	i1	Bergejala	i1	Bergejala
i7	Tidak Bergejala	i7	Tidak Bergejala	i7	Tidak Bergejala
i8	Tidak Bergejala	i8	Tidak Bergejala	i8	Tidak Bergejala
i13	Tidak Bergejala	i13	Tidak Bergejala	i13	Bergejala
i14	Bergejala	i14	Bergejala	i14	Bergejala
i15	Tidak Bergejala	i15	Tidak Bergejala	i15	Bergejala
i17	Tidak Bergejala	i17	Tidak Bergejala	i17	Tidak Bergejala
i19	Tidak Bergejala	i19	Tidak Bergejala	i19	Bergejala
i20	Bergejala	i20	Bergejala	i20	Bergejala
i21	Tidak Bergejala	i21	Tidak Bergejala	i21	Bergejala
i22	Tidak Bergejala	i22	Tidak Bergejala	i22	Bergejala
i23	Tidak Bergejala	i23	Tidak Bergejala	i23	Bergejala
i24	Tidak Bergejala	i24	Tidak Bergejala	i24	Bergejala
i25	Tidak Bergejala	i25	Tidak Bergejala	i25	Bergejala
i26	Tidak Bergejala	i26	Tidak Bergejala	i26	Tidak Bergejala
i27	Tidak Bergejala	i27	Tidak Bergejala	i27	Bergejala
i28	Tidak Bergejala	i28	Tidak Bergejala	i28	Tidak Bergejala

Berdasarkan hasil pengujian isolat bakteri terhadap umbi kentang selama 3 hari pengamatan menunjukkan gejala busuk dengan jaringan lunak, muncul lendir pada bagian yang terserang, warna umbi menjadi kuning kecoklatan serta mengeluarkan bau tidak sedap saat gejala meluas. Gejala tersebut serupa dengan yang dikemukakan Istifadah *et al.* (2017) bagian yang dilukai dan inokulasi patogen tampak busuk mengendap dan apabila umbi kentang dibelah, umbi kentang menjadi busuk berlendir yang semakin meluas. Hasil pengujian tersebut juga sesuai dengan Agrios (2004) umbi kentang yang terserang bakteri *E. carotovora* mulanya tidak berbau, kemudian mengeluarkan bau tidak sedap ketika umbi mulai terinfeksi hampir seluruh bagian, jaringan membusuk lunak dan kental. Ketika

umbi dipotong melintang, bagian dalam terlihat basah seperti bubur serta berwarna kuning kecoklatan.

Uji busuk lunak pada 18 isolat yang telah dimurnikan, mendapatkan hasil bahwa isolat mampu menyebabkan busuk lunak pada umbi kentang. Dua belas isolat bakteri I1, I13, I14, I15, I19, I20, I21, I22, I23, I24, I25 dan I26 mengeluarkan bau yang tidak sedap pada hari ke 3 setelah inokulasi. Umbi kentang yang telah diinokulasi bakteri patogen, ketika dibelah secara melintang terlihat busuk, berair, tekstur umbi lembek dan berubah warna kehitaman sedangkan umbi kentang yang tidak diinokulasikan bakteri kontrol tidak menunjukkan adanya busuk dan berair. Menurut Masnilah *et al.*, (2013), bakteri yang mampu membuat umbi kentang busuk adalah

bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteolitik.

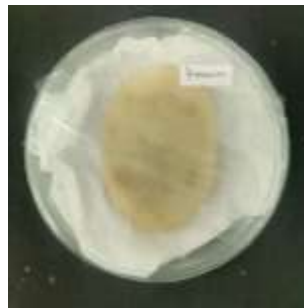
Isolat bakteri antagonis terdapat pada perlakuan I7, I8, I17, I26, dan I28 yang tidak mengalami gejala busuk lunak pada umbi kentang yang diinokulasikan dengan bakteri *Bacillus*. hal ini berarti bahwa mekanisme penghambatan penyakit tersebut adalah karena isolat bakteri antagonis menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menghambat perkembangan patogen. Selain itu, penghambatan perkembangan penyakit kemungkinan juga dapat terjadi karena isolat

bakteri antagonis yang diuji dapat meningkatkan ketahanan umbi kentang. Kemampuan bakteri antagonis untuk menginduksi ketahanan tanaman terhadap penyakit telah banyak dilaporkan (Benhamou *et al.*, 2000; Kloepper & Ryu, 2006). Pada penelitian lain, bakteri endofit isolat CK U3 (*Lysin bacillus* sp.) dan PG A6 (*Bacillus* sp.) ternyata memang dapat menginduksi ketahanan tanaman kentang terhadap penyakit bercak kering yang disebabkan oleh *Alternaria solani* (Syahida, 2016).

Gambar. Pengamatan umbi yang bergejala selama 3 hari



Gambar. Pengamatan umbi kentang kontrol selama 3 hari



Pengamatan umbi kentang

Gambar. Pengamatan umbi kentang yang tidak bergejala selama 3 hari

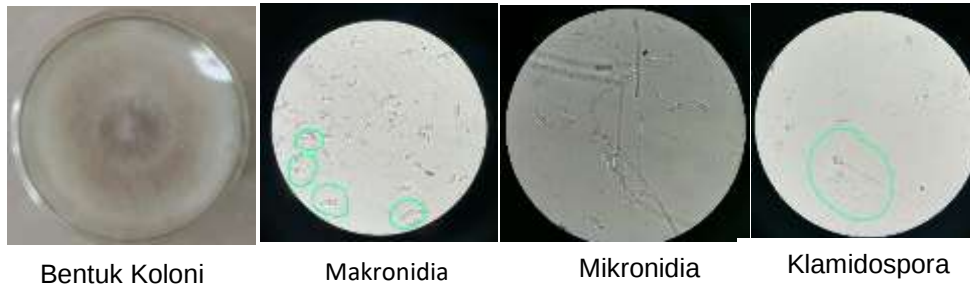


Pegamatan umbi kentan tidak bergejala selama 3 hari

Hasil identifikasi morfologi patogen secara makroskopis adalah koloni jamur *Fusarium* pada media PDA terlihat tampak seperti kapas berwarna putih saat dilihat dari atas cawan petri, sedangkan hasil biakan murni jamur *Fusarium* juga berwarna putih agak krem

berserabut dan tumbuh melingkar hingga memenuhi cawan petri saat dilihat dari atas serta berwarna kuning pada bagian bawah di dekat pusat koloninya apabila dilihat dari cawan petri.

Gambar Identifikasi Patogen Penyakit Layu *Fusarium* sp



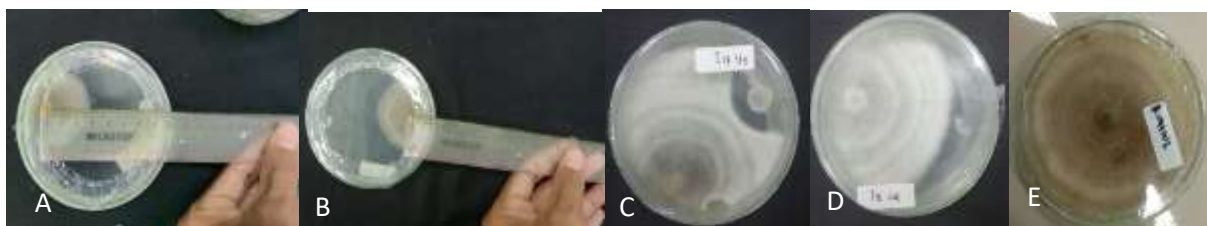
Hasil identifikasi jamur *Fusarium* mikroskopis saat diamati menggunakan mikroskop cahaya terdiri atas mikronidia, dan konidiofor. Hal ini sesuai penelitian Mahendra (2008) yang menjelaskan bahwa secara mikroskopis karakter morfologi yang paling banyak ditemui pada jamur *Fusarium* adalah mikronidia, makronidia, konidiofor, serta monofialid atau poli fialid.

Makronidia jamur *Fusarium* memiliki sekat yang berjumlah 3 hingga 5 serta berbentuk panjang seperti bulan sabit yaitu sedikit membengkok dan meruncing pada kedua ujungnya (Gambar). Hal ini sesuai dengan pernyataan Susetyo (2010) yang menyatakan bahwa makronidia memiliki bentuk yang khas, melengkung seperti bulan sabit terdiri dari 3-5 sekat. Makronidia jamur *Fusarium* yang diamati hialin atau tidak berwarna dan memiliki ukuran panjang yang beragam, yaitu 45,61 μm , 32,64 μm , 39,34 μm dengan panjang sekat 4,97 μm .

Konidiofor jamur *Fusarium* juga hialin atau tidak berwarna. Ada yang bercabang-cabang dan ada pula tidak bercabang. Menurut Gandjar (2006) konidiofor jamur *Fusarium* ada yang bercabang dan ada pula yang tidak serta membawa monofialid. Konidiofor ini memiliki ukuran Panjang 766,78 μm .

Uji Antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* sp.

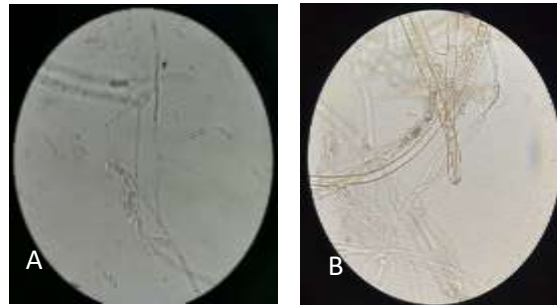
Berdasarkan hasil uji antagonis pada cawan petri 5 isolat yaitu I7, I8, I17, I26, I28 dengan 4 kali ulangan sehingga mendapatkan 20 isolat dalam menghambat patogen ditunjukkan oleh terhambatnya pertumbuhan bagian jari-jari koloni patogen yang mengarah ke isolat dan mampu menghasilkan daya hambat yaitu isolat I17 dengan presentase 4,3 mm sedangkan isolat tidak menghasilkan daya hambat adalah jari-jari koloni jamur *Fusarium* mengarah ke koloni antagonis sampai menutup semua koloni bakteri.



Gambar. (A) Jari-jari yang mendekati *Bacillus* spp, (B) Jari-jari yang menjauhi bakteri *Bacillus* sp., (C) Daya Hambat Uji Antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* spp. (D) Tidak terjadi daya hambat uji Antagonis *Bacillus* spp. terhadap *Fusarium* spp.

Pengamatan Morfologi *Fusarium* sp. Pasca Uji Antagonis In vitro

Hasil pengamatan morfologi *Fusarium* sp. secara mikroskopis pada perbesaran 400x



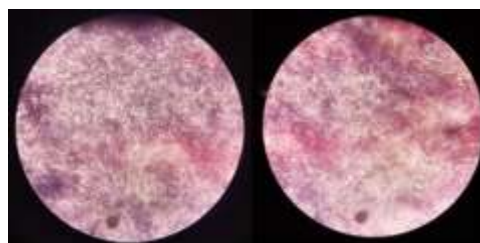
Gambar. (A) Hifa normal sebelum uji antagonis, (B) Hifa *fusarium* sp. Abnormal Akibat Perlakuan *Bacillus* sp.. Hifa Lisis Perbesaran 100x, a. Hifa Membelok, b. Hifa Keriting.

Morfologi hifa *fusarium* sp. Yang diberikan perlakuan bakteri antagonis tampak berbeda dengan sebelum yang diberikan perlakuan. Perlakuan hifa menunjukkan perkembangan yang abnormal yaitu membengkak, mengecil, lisis, melilit, membengkok dan keriting. Perkembangan hifa membengkok, mengecil, dan lisis diakibatkan perlakuan bakteri *bacillus* spp. kode isolat I7 U1, I7 U2, I7 U3, I7 U4

menunjukkan pada perlakuan kontrol hifa tampak normal dan tidak menunjukkan perbedaan morfologi dengan *Fusarium* sp. sebelum diberikan perlakuan.

Pewarnaan Gram

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram pada isolat I17 bakteri *Bacillus* sp. didapatkan hasil berupa bakteri isolat *Bacillus* sp. rhizosfer tanaman kentang merupakan bakteri gram positif. Hal ini didasarkan pada karakteristik berupa sel *Bacillus* sp. berwarna ungu pada saat dilakukan uji pewarnaan gram.



Gambar. Hasil Pewarnaan Gram

Pendapat Yusra, *et al.* (2014) pengamatan secara mikroskopik terhadap bakteri gram positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada sel bakteri. Hal tersebut disebabkan karena bakteri ini mempunyai kandungan lipid yang lebih rendah, sehingga dinding sel bakteri akan lebih mudah terdehidrasi akibat perlakuan dengan alkohol. Dinding sel yang terdehidrasi menyebabkan ukuran pori-pori sel menjadi kecil dan permeabilitasnya berkurang sehingga zat warna ungu kristal yang merupakan zat warna utama tidak dapat keluar dari sel dan sel akan tetap berwarna ungu. Sedangkan bakteri gram negatif terlihat berwarna merah karena bakteri ini kehilangan pewarna kristal violet

pada waktu pembilasan dengan alkohol namun mampu menyerap pewarna tandingan yaitu safranin.

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan mengetahui kemurnian sel bakteri (Fardiaz, 1993). Bakteri *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif, dimana bakteri yang gram positif adalah bakteri yang memiliki warna ungu yang disebabkan karena bakteri mempertahankan warna pertama, yaitu gentian violet. Perbedaan sifat gram dipengaruhi oleh kandungan pada dinding sel, yaitu bakteri gram positif karena kandungan peptidoglikan lebih tebal jika dibandingkan dengan gram negatif.

SIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian tentang Eksplorasi Bakteri *Bacillus* spp. pada perakaran tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) Sebagai Agensia Pengendalian Hayati Patogen *Fusarium* sp. Asal Lahan Wonokitri, Kabupaten Pasuruan Jawa Timur.

Hasil Isolasi dari perakaran tanaman kentang mendapatkan 37 isolat bakteri, selanjutnya melakukan tes tring bakteri positif menggunakan uji KOH 3% dan uji katalase sehingga mendapatkan 19 isolat, Dilanjutkan dengan uji patogenisitas yang terdapat tidak menghasilkan gejala busuk lunak sebanyak 5 isolat.

Dari 19 isolat bakteri dilakukan uji lanjut patogenisitas dan mendapatkan hasil positif yang tidak bergejala *Soft rot* sebanyak 5 isolat bakteri, dilanjutkan dengan uji antagonis.

Secara uji antagonis *Bacillus* sp. terhadap penyakit layu *Fusarium* secara *In vitro* kode isolat I17 menyebabkan tingkat hambatan pertumbuhan penyakit layu *fusarium* sebesar 36,89% dibandingka dengan 4 isolat laju penyakit *fusarium* sangat cepat mengelilingi area bakteri

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu perjalanan proses penelitian ini dari hingga akhir.

DAFTAR PUSTAKA

Abidin, Z., L.Q. Aini., dan A.L. Abadi. 2015. "Pengaruh Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. Penyebab Penyakit Rebah Semai pada Tanaman Kedelai". *Jurnal HPT*, 3 (1) : 1-10

Amrulloh, I. 2008. Uji potensi Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Xanthomonas oryzae* dan Jamur *Fusarium oxysporum*. *Skripsi pdf*. Malang : Fakultas Sains dan Teknologi

Chen, Y., F. Yan, Y. Chai, H. Liu, R. Kolter, R. Losick, and J.H. Guo. 2013. Biocontrol of Tomato Wilt Disease by *Bacillus subtilis* Isolates from Natural Environments Depends on Conserved Genes Mediating Biofilm Formation. *Environ. Microbiol.* 15(3): 848– 864

Djaenuddin, N., N. Nonci, dan A. Muis. 2014. Viabilitas dan Uji Formulasi Bakteri Antagonis sebagai Biopestisida Pengendalian Penyakit Hawar Upih Daun *Rhizoctonia solani* dan Bercak Daun *Bipolaris maydis*. *Laporan Akhir Tahun*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros.

Fovo, J. D., Dostaler, D., dan Bernier, L. (2017). Influence of culture media and temperature on growth and sporulation of *Lasioidiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis microspora* and *Fusarium oxysporum* Isolated from *Ricinodendron heudelotii* in Cameroon. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 3098–3112.

Ishartati, E., Ruhiyat, M., dan Juliati, R. (2019, October). Produksi Benih Kentang Melalui Teknik Kultur In Vitro. In *Conference on Innovation and Application of Science and Technology (CIASTECH)* (Vol. 1, No. 1, pp. 274-280).

Jawetz, Melnick, Adelberg's, 2008, *Mikrobiologi Kedokteran* Edisi 23, Diterjemahkan oleh Huriawati h., Chaerunnisa R., Alifa D., Alyana D., Hal 266-269 EGC, Jakarta

Karjadi, A. K. dan A. Buchory. 2008. Pengaruh Auksin dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Jaringan Meristem Kentang Kultivar Granola. 18(4):380-384

Mukarlina 2010. Uji antagonis *Trichoderma harzianum* terhadap *Fusarium* spp.

- penyebab penyakit layu pada tanaman cabai (*Capsicum annum*) secara in- vitro. Jurnal Fitomedika 7(2): 80-85.
- Nugraheni, 2010. "Karakterisasi Biologi Isolat-isolat *Fusarium* sp. pada tanaman cabai merah (*Capsicum annum* l.) asal Boyolali
- Pakpahan, M., Ekowati, C.N., dan K. Handayani. 2013. Karakterisasi Fisiologi dan Pertumbuhan Isolat Bakteri *Bacillus Thuringiensis* dari Tanah Naungan di Lingkungan Universitas Lampung. Lembaga Penelitian Universitas Lampung.
- Prihatingsih N, Arwiyanto T, Hadisutrisno B, Widada J. 2015. Mekanisme antibiosis *Bacillus subtilis* b315 untuk pengendalian penyakit layu bakteri kentang. J HPT Tropika 15 (1):64-71
- Raharjo 2017. Pengendalian Hayati Penyakit Lodoh (*Busuk Umbi Kentang*) dengan Agens Hayati Jamur-jamur Antagonis Isolat Lokal. *Jurnal Bioma*. 10(2): 13-19.
- Singh R. 2012. Evaluation of Antimicrobial Activity of Piper betle cultivars. 1(1):50-58. *Novus International Journal of Pharmaceutical Technology. India*
- Soekarno, B. P. W., Surono, dan Hendra. 2013. Optimalisasi Peran Kompos Bioaktif dengan Penambahan Asam Humat dan Asam Fulvat untuk Meningkatkan Ketahanan Tanaman Mentimun Terhadap Serangan *Pythium* sp. *Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. 15 (1) : 35 – 43.
- Suryanti, Suryanti, Universitas Gadjah Mada, Tri Joko, and Universitas Gadjah Mada. 2013. "Eksplorasi Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Agens Pengendali Hayati *Fusarium* Solani dan *Meloidogyne Incognita* pada Lada." *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 18(2): 89–94
- Susetyo, A. R. 2010. Hubungan Keanekaragaman Cendawan *Rizosfer* Tanaman Pisang (*Musa* sp.) dan Penyakit Layu *Fusarium*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology (USA)*.
- Sutariati, G. A. K dan A. Wahab. 2010. Isolasi dan Uji Kemampuan Rizobakteri Indigenos sebagai Agensia Pengendalian Hayati Penyakit pada Tanaman Cabai. *Jurnal Hortikultura* 20 (1) : 86-95.
- Wulandari, Destik *et al.* 2019. Dentifikasi dan karakterisasi bakteri Amilolitik pada Umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *J Bioteknol Biosains Indonesia Vol 6 No 2*.