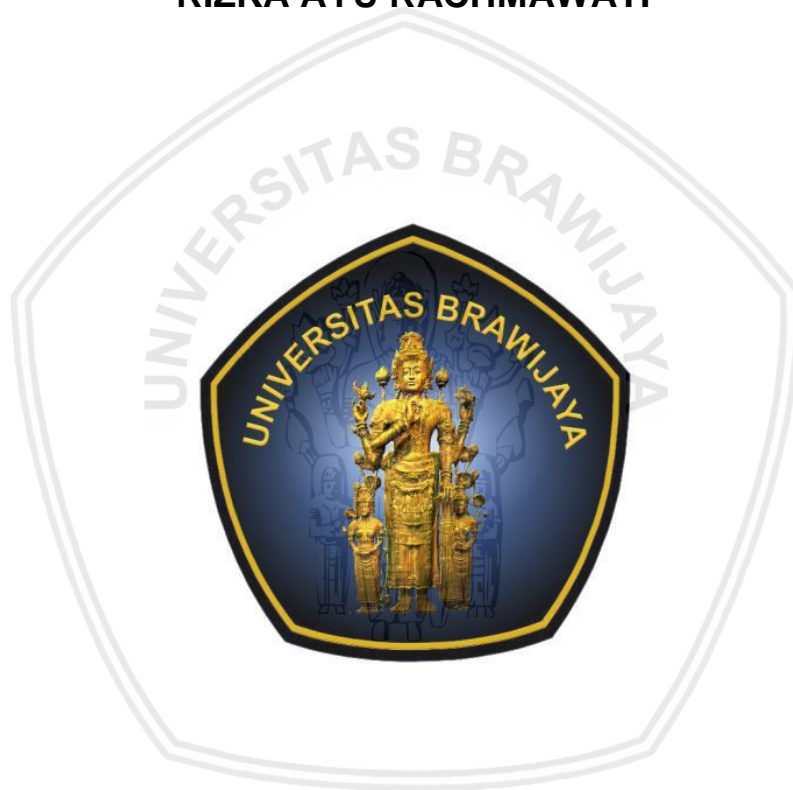


**EKSPLORASI INDIGENOUS PGPR DARI RIZOSFER
TANAMAN BAMBU DI UB *FOREST* DAN POTENSINYA
SEBAGAI AGENS ANTAGONIS TERHADAP
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae***

Oleh
RIZKA AYU RACHMAWATI



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG**

2019

**EKSPLORASI INDIGENOUS PGPR DARI RIZOSFER
TANAMAN BAMBU DI UB *FOREST* DAN POTENSINYA
SEBAGAI AGENS ANTAGONIS TERHADAP
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae***

SKRIPSI

Oleh

**RIZKA AYU RACHMAWATI
155040200111186**

**PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI
MINAT STUDI PERLINDUNGAN TANAMAN**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana
Pertanian Strata Satu (S-1)**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
MALANG
2019**

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan komisi pembimbing. Skripsi ini tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar di perguruan tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya tau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukkannya dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

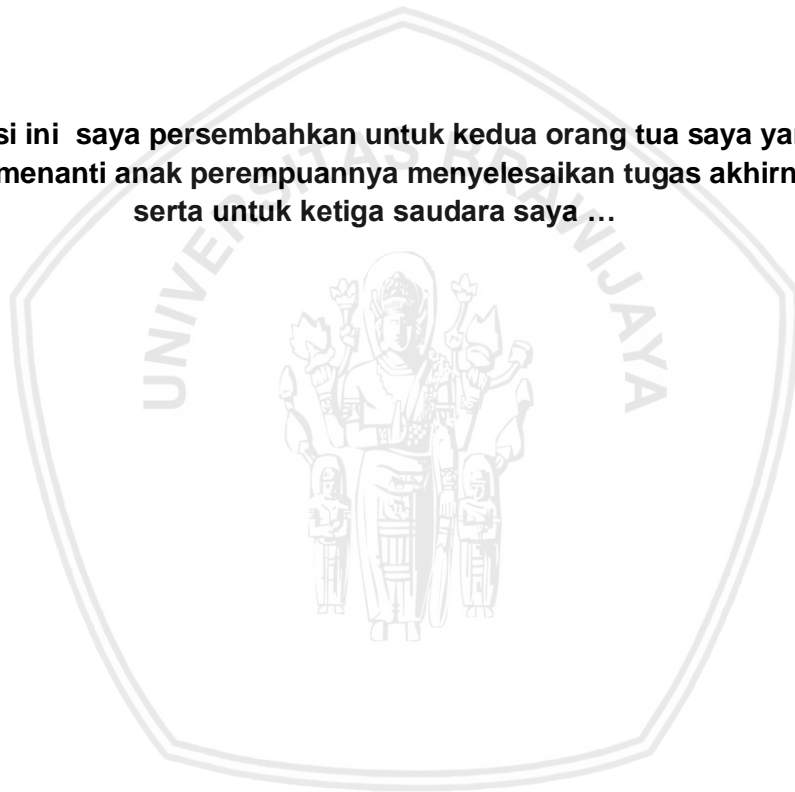
Malang, 28 Juni 2019

Rizka Ayu Rachmawati





Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua saya yang telah menanti anak perempuannya menyelesaikan tugas akhirnya serta untuk ketiga saudara saya ...



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Eksplorasi Indigenous PGPR dari Rizosfer Tanaman Bambu di UB Forest dan Potensinya Sebagai Agens Antagonis terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Nama Mahasiswa : Rizka Ayu Rachmawati

NIM : 155040200111186

Jurusan : Hama dan Penyakit Tumbuhan

Program Studi : Agroekoteknologi

Menyetujui : Dosen Pembimbing

Disetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS
NIP. 19550821 198002 1 002

Restu Rizkyta Kusuma SP., M.Sc
NIK. 201409 880504 2 001

Diketahui,
Ketua Jurusan Hama dan Penyakit
Tumbuhan,

Dr.Ir. Ludji Pantja Atuti, MS.
NIP. 19551018 198601 2 001

Tanggal Lulus :

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I

Penguji II

Lugman Qurata Aini, SP., M.Si., PhD
NIP. 19720919 199802 1 001

Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, MS.
NIP. 19590705 198601 1 003

Penguji III,

Penguji IV

Prof.Dr.Ir. Abdul Latief Abadi, MS
NIP. 19550821 198002 1 002

Restu Rizkyta Kusuma SP., M.Sc
NIK. 201409 880504 2 001

Tanggal Lulus :

RINGKASAN

Rizka Ayu Rachmawati. 155040200111186. Eksplorasi Indigenous PGPR dari Rizosfer Tanaman Bambu di UB Forest dan Potensinya Sebagai Agens Antagonis Terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS. sebagai Pembimbing Utama dan Restu Rizkyta, SP., M.Sc sebagai Pembimbing Pendamping.

Padi merupakan tanaman pangan utama di dunia. Faktor terkait produksinya selalu menjadi perhatian, salah satunya adalah penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Pengendalian secara kimia masih menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan, sehingga perlu dikembangkan pengendalian secara hayati. Sumber keanekaragaman hayati yaitu hutan pendidikan UB Forest. Rizosfer atau daerah perakaran tanaman diketahui berpotensi sebagai sumber keragaman mikroorganisme, terutama bagi bakteri yang bersifat sebagai PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Salah satu tanaman yang diduga memiliki potensi sebagai PGPR adalah pada rizosfer tanaman bambu. Tujuan penelitian yaitu untuk mengkaji keberadaan indigenous PGPR rizosfer tanaman bambu di kawasan UB Forest dan potensinya sebagai agens antagonis terhadap Xoo.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya pada bulan Januari hingga Mei 2019. Tahapan pada penelitian ini yaitu isolasi bakteri rizosfer, seleksi bakteri PGPR, seleksi uji antagonis bakteri, uji penghambatan bakteri, dan karakterisasi serta identifikasi bakteri.

Hasil isolasi dari rizosfer tanaman bambu telah diperoleh 59 isolat bakteri yang memiliki bentuk, warna dan ukuran berbeda. Hasil seleksi bakteri yang bersifat sebagai PGPR menunjukkan 45 isolat mampu menambat nitrogen berdasarkan pertumbuhan pada media Burk, 48 isolat mampu melarutkan fosfor berdasarkan zona bening (*halozone*) yang dihasilkan pada media Pikovskaya dan 37 isolat yang memiliki sifat keduanya. Dari 37 isolat tersebut, 5 diantaranya mempunyai potensi antagonis terhadap Xoo berdasarkan zona hambat yang terbentuk. Kelima isolat dengan kode B6.2, E3.2, E1.1, A1.3 dan A4.3 mampu menambat nitrogen, melarutkan fosfat dan bersifat antagonis terhadap Xoo. Hasil uji antagonis menunjukkan zona hambat yang dihasilkan dari kelima bakteri terhadap Xoo tidak berbeda nyata.. Hasil identifikasi secara morfologi, fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa isolat dengan kode B6.2 dan E3.2 merupakan bakteri dari genus *Pantoea* sp. Bakteri dengan kode isolat E1.1, A1.3, A4.3 merupakan bakteri dari genus *Erwinia* sp.

SUMMARY

Rizka Ayu Rachmawati. 155040200111186. Exploration of Indigenous PGPR from Rhizosphere of Bamboo Plants in UB Forest and Its Potential as Antagonistic Agents Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Supervised by Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS. As main supervisor and Restu Rizkyta, SP., M.Sc as companion supervisor

Rice is the main food crop in the world. Factors related to production is always a concern, one of them is bacterial leaf blight disease caused by the pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Chemical control is still a negative impact on the environment, so it needs to be developed as a biological control. Source of biodiversity is educational forest UB Forest. Rhizosphere or root zone of plants known potential as a source of diversity of microorganisms, especially for bacteria that are as PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). One of the plants suspected of having the potential of bacteria in the rhizosphere PGPR is the bamboo plant. The purpose of research is to examine the existence of indigenous rhizosphere PGPR bacterial bamboo plants in UB Forest region and its potential as an agent antagonist against Xoo.

The research was conducted at the Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Brawijaya in January to May 2019. The stages in this study is isolation of bacterial rhizosphere, PGPR bacterial selection, selection of test antagonist bacteria, bacterial inhibition test and characterization and identification of bacteria.

Isolated from the rhizosphere of plants bamboo has obtained 59 isolates of bacteria that have shapes, colors and different sizes. The result of the selection of bacteria that are as PGPR showed 45 isolates were able to tie up nitrogen by growth in Burk media, 48 isolates capable of dissolving phosphorus based clear zone (*halozone*) generated in the Pikovskaya media and 37 isolates that have both properties. The five isolates with codes B6.2, E3.2, E1.1, A1.3 and A4.3 are able to anchor nitrogen, dissolve phosphate and are antagonistic to Xoo. The antagonistic test results showed that the inhibition zones produced from the five bacteria against Xoo are not significantly different. The identification results in morphology, physiology and biochemistry showed that isolates with codes B6.2 and E3.2 are bacteria from the genus *Pantoea* sp. Bacteria with code isolates E1.1, A1.3, A4.3 are bacteria from the genus *Erwinia* sp.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala limpahan rahmat, hidayah dan inayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul "Eksplorasi Indigeous PGPR dari Rizosfer Tanaman Bambu di UB *Forest* dan Potensinya Sebagai Agens Antagonis Terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*" ini sebagai suatu syarat untuk menyelesaikan program S1 Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Skripsi ini dapat terwujud berkat kerjasama dan bantuan dari berbagai pihak, untuk itu dalam kesempatan ini perkenalkan penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS selaku dosen pembimbing utama dan Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc. sebagai pembimbing pendamping atas segala, nasihat dan arahan serta yang telah memberikan bimbingan dalam penyusunan skripsi. Terima kasih kepada keluarga khususnya kedua orang tua atas motivasi dan dukungannya serta kepada para sahabat yang selalu membantu dalam proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih ada kekurangan. Diharapkan skripsi ini mampu bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Juni 2019

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Desa Sumbergedang, Kecamatan Pandaan, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur pada tanggal 9 Oktober 1996 sebagai anak ketiga dari empat bersaudara dari orang tua Bapak Nanang Hariyanto dan Ibu Suhartatik. Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Darma Wanita 1 Pandaan pada tahun 2000-2003, pendidikan dasar di SDN 1 Petungasri pada tahun 2003-2009, pendidikan menengah pertaman di SMPN 2 Pandaan pada tahun 2009-2012, pendidikan menengah atas di SMAN 1 Pandaan pada tahun 2012-2015. Pada tahun 2015, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Strata-1 di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang melalui seleksi tertulis SBMPTN. Pada semester 6 penulis memilih jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan akademik ataupun non-akademik. Penulis pernah menjadi staff magang di organisasi PRISMA (Pusat Riset dan Kajian Mahasiswa) pada tahun 2016, menjadi asisten matakuliah Dasar Budidaya Tanaman pada tahun 2017-2019, Ekologi Pertanian 2017-2019, dan Manajemen Agroekosistem pada tahun 2018. Penulis pernah mengikuti kegiatan magang kerja di PT. DuPont Agricultural Products pada tahun 2018. Selain itu, penulis juga aktif pada kegiatan kepanitian diantaranya Inaugurasi FP UB 2015 sebagai anggota Konkes, Rantai V pada tahun 2016, dan Raja Brawijaya 2017 sebagai anggota divisi kesehatan

DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	1
SUMMARY	ii
KATA PENGANTAR	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi	4
2.2 Bakteri Rizosfer.....	5
2.3 Bakteri Indigenous.....	7
2.4 Tanaman Bambu.....	7
2.5 Bakteri PGPR.....	8
2.6 Mekanisme Agens Antagonis	9
III. METODE PELAKSANAAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Metode Penelitian.....	11
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	11
3.5 Variabel Pengamatan.....	19
3.6 Analisis Data	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	20

4.1 Seleksi Bakteri Hasil Eksplorasi yang Bersifat sebagai PGPR.....	20
4.2 Hasil Seleksi Bakteri PGPR sebagai Agens Antagonis Terhadap Patogen <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	23
4.3 Hasil Uji Antagonis <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> secara <i>in vitro</i>	23
4.4 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Hasil Isolasi	26
4.5 Pembahasan Umum	33
V. KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	42



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Kerangka Identifikasi Bakteri Sampai Tingkat Genus Bergey's Determinative Bacteriology (Holt <i>et al.</i> , 1994) dan Schaad <i>et al.</i> , (2001).	17
2.	Diagram Pengujian Bakteri Hingga Tingkat Genus (Schaad <i>et al.</i> , (2001)	18
3.	Pertumbuhan bakteri pada media Burk a. Bakteri penambat nitrogen yang tumbuh pada media Burk, b. Bakteri yang tidak tumbuh pada media Burk.....	21
4.	Pertumbuhan bakteri pada media Pikovskaya dengan masa inkubasi 72 jam a. Bakteri menghasilkan zona bening, b. Bakteri tidak menghasilkan zona bening.....	22
5.	Zona bening yang dihasilkan bakteri hasil uji antagonis terhadap Xoo pada 3 HSI a. Kontrol negatif b. Kontrol positif c. Bakteri isolat kode B6.2, d. Bakteri isolat kode E1.1, e. Bakteri isolat kode E3.2, f. Bakteri isolat kode A4.3, g. Bakteri isolat kode A1.3.....	25
6.	Hasil karakterisasi morfologi koloni bakteri agens antagonis hasil eksplorasi a. Bakteri isolat kode B6.2, b. Bakteri isolat kode E1.1, c. Bakteri isolat kode E3.2, d. Bakteri isolat kode A1.3, e. Bakteri isolat kode A4.3.	27
7.	Hasil uji hipersensitif bakteri agens antagonis hasil eksplorasi pada daun tembakau pada 3 HSI a. Kontrol negatif akuades, b. Kontrol positif patogen Xoo c. Bakteri isolat kode B6.2.....	28
8.	Hasil pewarnaan Gram bakteri agens antagonis hasil eksplorasi dengan perbesaran 100x pada bakteri isolat kode B6.1.	29
9.	Hasil uji KOH 3% bakteri hasil eksplorasi pada isolat B6.....	30
10.	Hasil uji Oksidatif-Fermentatif bakteri B6.2 yang bersifat Fermentatif.	30
11.	Kenampakan morfologi warna kuning pada koloni bakteri B6.2 pada media YDC.	31
12.	Hasil uji katalase isolat bakteri B6.2 yang bereaksi positif.	32



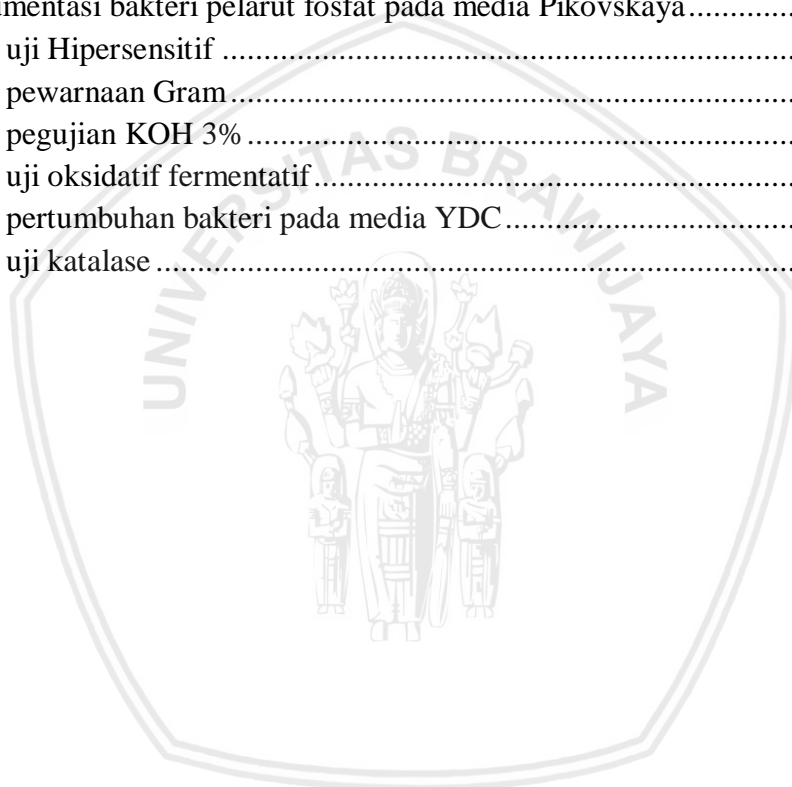
DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Perlakuan uji antagonis bakteri rizosfer terhadap Xoo	14
2.	Hasil seleksi bakteri penambat Nitrogen pada media Burk	20
3.	Hasil seleksi bakteri pearut Fosfat pada media Pikovskaya.....	22
4.	Hasil uji Agens Antagonis 37 bakteri terhadap <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	23
5.	Hasil uji rerata indeks penghambatan (mm) bakteri hasil seleksi dengan patogen Xoo	24
6.	Hasil analisa uji ragam pada 1 HSI.....	42
7.	Hasil analisa uji ragam pada 2 HSI.....	42
8.	Hasil analisa uji ragam 3 HSI.....	42



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Hasil analisa uji ragam	42
2.	Komposisi media Burk.....	42
3.	Komposisi media Pikovskaya.....	43
4.	Dokumentasi pengamatan pertumbuhan bakteri penambatan nitrogen pada media Burk	43
5.	Dokumentasi bakteri pelarut fosfat pada media Pikovskaya.....	44
6.	Hasil uji Hipersensitif	44
7.	Hasil pewarnaan Gram.....	45
8.	Hasil pegujian KOH 3%	46
9.	Hasil uji oksidatif fermentatif	46
10.	Hasil pertumbuhan bakteri pada media YDC.....	47
11.	Hasil uji katalase	47



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman pangan utama di Indonesia. Indonesia merupakan negara produsen beras yang sekaligus merupakan negara konsumen terbesar di Asia Tenggara. Angka pertumbuhan pemanfaatan beras dunia yang rata-rata lebih tinggi dari pertumbuhan rata-rata produksi beras dunia perlu mendapatkan perhatian yang serius (Hermanto *et al.*, 2015). Oleh karena itu, permasalahan terkait faktor produksinya sangat diperhatikan. Salah satu faktor penghambat produksi pada padi yakni adanya serangan patogen penyebab penyakit tumbuhan.

Salah satu penyakit penting pada tanaman padi pada negara-negara penghasil padi di dunia adalah penyakit hawar daun bakteri atau HDB yang disebabkan oleh patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* atau Xoo (Zhang and Wang, 2013). Xoo dilaporkan menjadi patogen penting penyebab hawar daun yang mampu menurunkan produksi padi dengan kehilangan hasil mencapai 20,6-35,6% pada musim hujan dan 7,5-23,8% pada musim kemarau (BPPOPT, 2007). Selain itu, tanaman padi yang terserang Xoo membuat gabah tidak terisi penuh atau bahkan hampa. Pada kondisi seperti ini kehilangan hasil mencapai 50-70 persen (BPTP, 2016).

Upaya pengendalian penyakit HDB terkendala oleh kemampuan patogen untuk membentuk strain baru yang lebih virulen sehingga teknologi pencarian varietas yang tahan terhadap penyakit HDB menjadi kurang efektif (Wahyudi, 2011). Pengendalian lainnya yang dianggap efektif adalah dengan penggunaan bakterisida yang merupakan pestisida anti bakteri. Namun, penggunaan bakterisida kimia sangat tidak dianjurkan, karena dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan dan kesehatan manusia akibat residu yang ditinggalkan (Sitaramaraju *et al.*, 2014). Oleh karena itu, pemanfaatan agen hayati lebih dianjurkan sebagai solusi pengendalian HDB yang efektif dan ramah lingkungan.

Hutan memiliki kekayaan flora dan fauna yang tinggi. Tingkat biodiversitas yang tinggi di hutan membuat hutan memiliki potensi sebagai sumber mikroorganisme yang tinggi. Salah satu mikroorganisme yang kurang diketahui pemanfaatannya adalah bakteri penghuni akar (rizosfer). Beberapa

penelitian melaporkan bahwa bakteri adalah mikroorganisme yang paling banyak ditemukan di dalam tanah bila dibandingkan dengan mikroorganisme lain seperti fungi dan protozoa (Batubara *et al.*, 2015). Rizosfer merupakan lingkungan di sekitar perakaran tanaman yang kaya akan nutrisi, eksudat yang dihasilkan oleh akar tanaman dan sangat diperlukan oleh mikroorganisme. Sejumlah bakteri mengkolonisasi akar, hidup secara simbiosis dengan memanfaatkan eksudat akar tanaman (Akhtar *et al.*, 2012). Menurut Beneduzi *et al.*, (2012) Kelompok bakteri ini mampu mensekresikan senyawa-senyawa yang berguna bagi pertumbuhan tanaman, menghasilkan antibiotik, kompetisi makanan dan menginduksi ketahanan tanaman terhadap patogen penyakit dan hama.

Bakteri rizosfer telah dilaporkan memiliki potensi sebagai PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) yang mampu menghambat pertumbuhan patogen tanaman melalui produksi senyawa antimikroba. Selain itu, Menurut Freeman *et al.*, (2002), PGPR dapat berperan sebagai *biostimulant* (memacu pertumbuhan tanaman), *biofertilizer* (melarutkan atau menambat unsur hara dalam tanah) dan *bioprotectant* (melindungi tanaman dari patogen). Salah satu hutan alami yaitu UB Forest. UB Forest merupakan hutan alami yang terletak di Dusun Summersari Desa Tawangaro Kecamatan Karangploso. Kawasan ini ditumbuhi berabagai jenis tanaman baik tanaman semusim maupun tanaman tahunan.

Tanaman bambu merupakan tanaman dari famili Graminae (rumput) yang dapat tumbuh sampai dengan ketinggian 3800 mdpl. Tanaman ini mampu menyesuaikan diri dengan kondisi tanah dan cuaca yang ada. Bambu merupakan satu-satunya tanaman yang dapat tumbuh dalam waktu yang singkat dibandingkan dengan tanaman kayu-kayuan. Dalam sehari bambu dapat bertambah panjang 30-90 cm (Raka *et al.*, 2016). Oleh karena itu, perakaran bambu diduga memiliki sistem yang mampu memacu pertumbuhan yaitu bakteri PGPR. Susanti *et al.*, (2015) juga melaporkan bahwa bakteri rizosfer dari tanaman Bambu di wilayah Bogor memiliki aktivitas antagonis terhadap pertumbuhan jamur *Phytophthora palmivora*. Sementara itu Darma (2016) menemukan bahwa *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari rizosfer bambu memiliki aktivitas antifungi terhadap *Sclerotium rolfsii*. Bakteri rizosfer juga dilaporkan sebagai salah satu agens hayati penghasil senyawa antifungi. Sumarno *et*

al.,(2014), juga menyebutkan bahwa bakteri rizosfer *Bacillus pumilus* dapat menghambat patogen Xoo.

Peran mikroorganisme yang besar dalam pemecahan berbagai masalah dilingkungan menjadi alasan dilakukan eksplorasi dan isolasi bakteri potensial yang keberadaannya melimpah didalam tanah. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengkaji apakah terdapat bakteri PGPR pada indigenous rizosfer tanaman bambu di UB *Forest* sebagai pengendali alternatif patogen hawar daun bakteri pada tanaman padi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan pada penelitian ini yaitu apakah indigenous bakteri rizosfer tanaman bambu di UB *Forest* bersifat sebagai PGPR dan dapat bersifat antagonis terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* atau patogen penyebab hawar daun bakteri pada tanaman padi ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengkaji keberadaan indigenous PGPR dari rizosfer tanaman bambu di UB *Forest* dan potensi antagonisnya terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* atau patogen penyebab hawar daun bakteri pada tanaman padi secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah pada rizosfer tanaman bambu di UB *Forest* terdapat indigenous PGPR yang bersifat antagonis terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* atau patogen penyebab hawar daun bakteri pada tanaman padi secara *in vitro*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai upaya dan landasan pengembangan PGPR yang dapat dimanfaatkan sebagai agens hayati untuk mengendalikan penyakit hawar daun bakteri tanaman padi secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) merupakan bakteri Gram negatif yang menyebabkan penyakit hawar daun bakteri (HDB) pada padi. HDB tergolong penyakit penting di banyak negara penghasil padi. Hal ini disebabkan karena HDB dapat mengurangi hasil panen dengan tingkat yang bervariasi, tergantung pada stadium pertumbuhan tanaman yang terinfeksi, tingkat kerentanan kultivar padi, dan kondisi lingkungan (Abdullah, 2006). Xoo tergolong kedalam Kingdom : Bacteria, Filum : Proteobacteria, kelas : Gammaproteobacteria, Ordo : Xanthomonadales, Famili : Xanthomonadaceae, Genus : *Xanthomonas* dan nama spesies *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Swings *et al.*, 1990). Penyebab penyakit (patogen) menginfeksi tanaman padi pada bagian daun dengan cara melalui luka daun atau melalui lubang alami berupa stomata dan merusak klorofil daun, sehingga menurunkan kemampuan tanaman untuk berfotosintesis. Apabila hal ini terjadi pada fase generatif maka proses pengisian gabah kurang sempurna (Sudir *et al.*, 2012). Pengujian patogenesitas Xoo biasanya dilakukan dengan cara melukai ujung daun padi yang menjadi lubang masuknya patogen kedalam tanaman padi. Melalui luka tersebut, bakteri kemudian bergerak sambil memperbanyak diri menuju xylem (Ou, 1985). Suparyono *et al.*, (2003), menyatakan bakteri ini masuk kedalam jaringan tanaman lalu memperbanyak diri di dalam epidermis yang menghubungkan dengan pembuluh pengangkut, kemudian tersebar ke jaringan lainnya dan menimbulkan gejala infeksi.

Penyebarannya pada wilayah persawahan melalui perantara air irigasi. 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 (Gnanamanickam *et al.*, 1999). Berdasarkan Sudir *et al.*, (2012), gejala kresek maupun hawar dimulai dari tepi daun, berwarna keabu-abuan dan lama-lama daun menjadi kering. Pada varietas rentan, gejala menjadi sistemik dan mirip gejala

terbakar. Apabila penularan terjadi pada saat tanaman berbunga maka gabah tidak terisi penuh bahkan hampa. Penularan Xoo dapat melalui eksudat yang dikeluarkan pada pagi hari saat cuaca lembab dan berembun, eksudat yang keluar berupa cairan kuning. Pada siang hari eksudat ini akan mengering dan menjadi bulat kecil berwarna kuning. Eksudat ini merupakan kumpulan massa bakteri yang mudah jatuh dan tersebar oleh angin dengan gesekan daun (Suparyono dan Sudir, 1992).

Bakteri Xoo bersifat Gram negatif, berbentuk batang pendek dengan ukuran $0,45 - 0,75 \times 0,65-2,1 \mu$, dengan satu flagella polar di salah satu ujungnya dengan ukuran $0,03-8,75 \mu$. Koloni bakteri berwarna kekuningan (Degrasi *et al.*, 2010). Patogen ini mempunyai tingkat virulensi yang bervariasi berdasarkan kemampuannya menginfeksi varietas padi yang mempunyai gen dengan resistensi yang berbeda dan interaksi antara gen virulen patogen dan gen tahan tanaman (Jha *et al.* 2007). Sifat virulensi patogen sangat mudah berubah, bergantung pada kondisi lingkungannya

Pengembangan varietas unggul berdaya hasil tinggi tetapi rentan HDB seperti varietas IR-64 menyebabkan penyakit ini berkembang dan menyebar ke seluruh sentra produksi padi, terutama di Jawa. Penyakit ini dapat menginfeksi tanaman padi pada semua fase pertumbuhan, mulai dari pesemaian sampai menjelang panen (Sudir *et al.*, 2012). Suparyono dan Sudir (1992) melaporkan bahwa ambang kerusakan penyakit HDB 20% pada dua minggu sebelum panen. Di atas ambang tersebut setiap kenaikan keparahan penyakit 10% akan meningkatkan kehilangan hasil 5-7%. Bakteri Xoo dilaporkan menjadi patogen penting penyebab hawar daun yang mampu menurunkan produksi padi dengan kehilangan hasil mencapai 20,6-35,6% pada musim hujan dan 7,5-23,8% pada musim kemarau (BPPOPT, 2007). Selain itu, tanaman padi yang terserang Xoo membuat gabah tidak terisi penuh atau bahkan hampa. Pada kondisi seperti ini kehilangan hasil mencapai 50-70 persen (BPTP, 2016).

2.2 Bakteri Rizosfer

Rizosfer merupakan daerah sekitar perakaran yang sifat-sifatnya baik kimia, fisik dan biologi dipengaruhi oleh aktivitas. Rizosfer dibagi menjadi dua, yaitu rizosfer bagian dalam (*inner rhizosphere*) yaitu daerah di permukaan

perakaran tanaman dan rizosfer bagian luar (*outer rhizosphere*) merupakan daerah di sekitar perakaran. Daerah rizosfer tersebut sering disebut sebagai Rhizoplane. Rhizoplane merupakan daerah permukaan akar tanaman (Handayanto dan Hairiah, 2007). Fungsi rizosfer dapat berperan sebagai pertahanan luar bagi tanaman terhadap serangan patogen akar. Secara teori, luasnya daerah rizosfer sangat dipengaruhi oleh seberapa luasnya daerah yang masih tercakup oleh luasnya aktivitas perakaran tanaman beserta dengan mikroorganisme yang berasosiasi dengan tanaman tersebut (Slyvia *et al.*, 2005).

Jumlah mikroorganisme pada rizosfer bagian dalam biasanya lebih besar dari pada rizosfer bagian luar, karena lebih banyak interaksi biokimia antara akar dan mikroba (Handayanto dan Hairiah, 2007). Pada daerah rizosfer terdapat sekitar 10^6 - 10^9 sel populasi bakteri dan fungi sekitar 10^5 - 10^6 per gram tanah rizosfer (Slyvia *et al.*, 2005). Populasi bakteri di dalam tanah dipengaruhi oleh faktor-faktor antara lain, yaitu kandungan air, tekstur tanah, ketersediaan substrat organik dalam tanah, pH, praktek pertanian, pemupukan, pemakaian pestisida dan penambahan bahan organik (Rao, 1994).

Mikroorganisme rizosfer dapat berpengaruh menguntungkan dan merugikan terhadap tanaman. Bakteri yang menguntungkan dapat menekan perkembangan patogen dan juga dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui berbagai mekanisme, di antaranya melalui produksi senyawa stimulan pertumbuhan seperti fitohormon (Rao 1982). Di dalam tanah banyak mikroba yang mempunyai kemampuan dalam melarutkan fosfat, kalium, nitrogen dan menghasilkan fitohormon. Mikroba ini dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan memproduksi senyawa fitohormon *Indole Acetic Acid* (IAA) sebagai nutrisi bagi tanaman (Aryantha *et al.*, 2004). Beberapa bakteri rizosfer yang telah digunakan sebagai inokulan antara lain *Agrobacterium tumifaciens*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp., (Slyvia *et al.*, 2005).

Rizosfer bambu dikenal sebagai *disease suppressive soil* atau penekan penyakit tanah dan telah digunakan sebagai media pertumbuhan bibit oleh petani lokal (Darma *et al.*, 2016). Hingga saat ini telah banyak dilaporkan mikroba antagonis potensial asal rizosfer bambu yang memiliki daya antagonisme terhadap patogen tular tanah (*soil-borne disease*) melalui mekanisme antagonis berupa

persaingan hidup, parasitisme, antibiosis, dan *induced systemic resistance* (Trianto dan Sumantri 2003). Fenomena ini dapat disebabkan oleh jenis bakteri yang beragam dapat mencerminkan kelimpahan mikroba tanah. Diketahui bahwa spesies tanaman memainkan peran penting dalam mempengaruhi keragaman komunitas mikroba tanah karena pelepasan senyawa organik, sehingga ada juga kemungkinan bahwa tanaman bambu itu sendiri adalah sumber daya yang belum dimanfaatkan untuk penemuan bakteri penghasil antimikroba

2.3 Bakteri Indigenus

Bakteri indigenus yaitu bakteri yang secara alami hidup bebas di alam dan memiliki berbagai macam manfaat bagi manusia. Beberapa hasil penelitian yang memanfaatkan bakteri indigenus telah banyak dilaporkan misalnya sebagai agen bioremediasi limbah, agen pengendali hayati tanaman, penghasil antibiotik, agen pelarut fosfat, penghasil enzim-enzim potensial yang pemanfaatannya dapat digunakan dalam bermacam bidang industri dan sebagainya (Batubara *et al.*, 2015). Bakteri indigenus merupakan mikroba pribumi atau alami yang diisolasi dari limbah yang jenisnya sama dengan jenis limbah yang akan dilakukan pengolahan yaitu limbah uranium cair aktivitas rendah (Yazid, 2014). Menurut Handayanto dan Hairiah (2007), Sebagian besar bakteri dapat dijumpai secara individu atau dalam bentuk koloni. Terdapat dua divisi utama bakteri ditinjau dari ekologiannya, yaitu (1) indigenus (*Autochthonous*) merupakan bakteri penghuni sebenarnya yang permanen, (2) bukan penghuni atau pendatang (*Allochthonous*) yang masuk ke tanah melalui curah hujan, jaringan penyakit, kotoran ternak atau limbah.

2.4 Tanaman Bambu

Bambu merupakan tanaman yang secara botanis dapat digolongkan pada famili Gramineae (rumput). Bambu mudah menyesuaikan diri dengan kondisi tanah dan cuaca yang ada, serta dapat tumbuh pada ketinggian sampai dengan 3800 m di atas permukaan laut (Raka *et al.*, 2016). Tanaman bambu merupakan tanaman yang dapat tumbuh di beberapa daerah di Indonesia. Banyak sekali spesies bambu dengan keragaman fungsinya. Di Indonesia terdapat 60 dari 200 spesies tanaman bambu yang ada di kawasan Asia Tenggara dan dapat dijumpai di

daerah yang bebas dari genangan air, mulai dari dataran rendah hingga pegunungan. Sifat adaptasi bambu yang tergolong tinggi membuat tanaman ini dapat tumbuh baik hampir di setiap jenis tanah (Widjaja, 1995).

Bambu tumbuh berumpun dan memiliki akar rimpang, yaitu semacam buhul yang bukan akar maupun tandang. Bambu memiliki ruas dan buku. Pada setiap ruas tumbuh cabang-cabang yang berukuran lebih kecil dibandingkan dengan buluhnya sendiri. Pada ruas-ruas ini, tumbuh akar-akar yang memungkinkan untuk memperbanyak tanaman dari potongan-potongan setiap ruasnya, disamping tunas-tunas rimpangnya. Bambu merupakan tanaman yang memiliki banyak kegunaan mulai dari benda kerajinan, bahan makanan, bahan industri sampai bahan konstruksi. Diantara pemanfaatan bambu antara lain digunakan sebagai topi, kursi, meja, lemari, alat musik angklung, sayur (rebung), kertas, dan bahan bangunan (Raka *et al.*, 2016).

Bambu merupakan tanaman yang dapat tumbuh dalam waktu yang singkat dibandingkan dengan tanaman kayu-kayuan. Hal ini merupakan keunggulan bambu dibandingkan tanaman berkayu lainnya. Dalam sehari bambu dapat bertambah panjang 30-90 cm. Rata-rata pertumbuhan bambu untuk mencapai usia dewasa dibutuhkan waktu 3-6 tahun. Pada umur ini, bambu memiliki mutu dan kekuatan yang paling tinggi. Bambu yang telah dipanen akan segera tergantikan oleh batang bambu yang baru. Hal ini berlangsung secara terus menerus secara cepat sehingga tidak perlu dikhawatirkan bambu ini akan mengalami kepunahan karena dipanen. Berbeda dengan kayu, setelah ditebang akan memerlukan waktu yang cukup lama untuk menggantinya dengan pohon yang baru (Raka *et al.*, 2016).

2.5 Bakteri PGPR

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) merupakan bakteri di sekitar perakaran dan hidup berkoloni menyelimuti akar yang berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman yaitu sebagai perangsang pertumbuhan (*biostimulants*) dengan mensintesis dan mengatur konsentrasi berbagai zat pengatur tumbuh seperti giberellin, asam indol asetat, etilen, dan sitokinin, sebagai penyedia hara dengan mengikat N_2 di udara secara asimbiosis dan melarutkan hara P dalam tanah dan sebagai pengendali patogent tanah

(*bioprotectants*) dengan cara menghasilkan berbagai metabolit anti patogen seperti siderophore, kitinase, β -1,3-glukanase, sianida dan antibiotik (Marom *et al.*, 2017).

Berdasarkan Widawati Dewi (2007), PGPR adalah bakteri sekitar perakaran yang dapat memacu pertumbuhan tanaman dan juga merupakan agens (mikroba) pengendali hayati yang menguntungkan bagi tanaman. Bakteri ini hidupnya disekitar perakaran dimana terdapat eksudat yang dikeluarkan akar sebagai nutrisi bagi mikroba. PGPR mampu memacu pertumbuhan tanaman melalui beberapa cara, diantaranya:

1. Mengeluarkan cairan yang mampu melarutkan mineral (misal Fosfat) sehingga menjadi unsur hara yang tersedia.
2. Merombak dan mengurai bahan organik (dekomposisi bahan organik) menjadi nutrisi tanaman.
3. Mengeluarkan enzim dan hormon yang berguna untuk memacu pertumbuhan tanaman.
4. Mengeluarkan antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan mikroba yang bersifat patogenik (mikroba penyebab penyakit).

2.6 Mekanisme Agens Antagonis

Mikroba antagonis atau agens pengendali hayati (APH) penyakit tanaman adalah jasad renik yang diperoleh dari alam, baik berupa bakteri, cendawan, actinomycetes maupun virus yang dapat menekan, menghambat atau memusnahkan organisme pengganggu tanaman (OPT) (Tombe 2002). Mekanisme penghambatan bakteri antagonis sebagai agens hayati pada tanaman dibagi menjadi dua, yaitu penghambatan secara langsung dan penghambatan secara tidak langsung. Pada penghambatan langsung, bakteri antagonis akan menghambat patogen dengan menghasilkan antibiotik dan bersaing dengan patogen untuk memperebutkan makanan atau tempat. Sedangkan, pada penghambatan tidak langsung, tanaman akan merubah morfologi, fisiologi dan biokimia tanaman termasuk respon hipersensitif dan produksi fitoaleksin yang menyebabkan terbentuknya sifat ketahanan tanaman atau induksi ketahanan sistemik (Gao *et al.*,

2010). Berikut beberapa mekanisme penghambatan oleh agens antagonis terhadap patogen secara umum :

1. Antibiosis

Antibiosis adalah penghambatan atau perusakan suatu mikroorganisme oleh metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroorganisme lainnya. Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dapat berupa senyawa alkaloida, fenol, flavonoida, glikosida, fitoaleskin (Hammerschmidt and Dann, 2000). Bakteri mengeluarkan zat antibiotik yang dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan suatu jenis patogen. Contohnya *Bacillus* sp. mampu berperan sebagai agens hayati patogen tumbuhan melalui mekanisme antibiosis dengan menghasilkan senyawa penghambat (senyawa antimikrobia) di antaranya antibiotik, peptida, senyawa fenol dan enzim, alkaloid, dan siderofor (Haggag and Mohamed, 2007).

2. Kompetisi

Kompetisi adalah peristiwa dua atau lebih mikroorganisme dalam suatu tempat yang sama untuk memperebutkan beberapa faktor yang menjadi kebutuhan bersama yaitu makanan (karbohidrat, nitrogen dan faktor tumbuh inang lainnya), tempat dan oksigen (Habazar dan Ycrwandi, 2006).

3. Induksi ketahanan sistemik

Induksi ketahanan sistemik adalah bentuk ketahanan terinduksitika tanaman mempertahankan diri dari serangan patogen. Ketahanan ini tidak menimbulkan kerusakan pada tanaman. Reaksi dapat terjadi karena adanya agen biokontrol pada bagian tanaman sehingga bagian lain merespon dengan meningkatkan metabolisme pertanaman (Van Loon, 1998).

III. METODE PELAKSANAAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan 1 Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dimulai pada bulan Januari sampai dengan Mei 2019.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cetok, gelas ukur, pengaduk, pisau, baskom, kompor listrik, timbangan analitik, *sprayer*, cawan Petri, bunsen, jarum Ose, gelas ukur, panci, pinset, tabung reaksi dan penyangga, pipet tetes, mikropipet, jarum suntik, gunting, cutter, *stick* L, botol media, mikrotube, pH meter, kamera, *autoclave*, *object glass*, *cover glass*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC).

Bahan yang digunakan antara lain, sampel tanah indigenous rizosfer tanaman bambu dari UB *Forest*, isolat bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, media *Natrium Agar* (NA), media Pikovskaya, media Burk, Media Yeast Dextrose Carbonat (YDC), media Oksidatif-Fermentatif, aluminium foil, plastik *wrapping*, kapas, bakterisida berbahan aktif Streptomisin, aquades steril, tisu steril, alkohol 70% dan 90%, plastik, kertas saring, KOH 3%, iodine, safranin, spirtus, Bromtimol blue, H₂O₂.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu, (1) pengambilan sampel tanah indigenous tanaman bambu dan isolasi bakteri, (2) seleksi bakteri rizosfer sebagai PGPR, (3) uji antagonis bakteri terhadap patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, (4) uji penghambatan terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secara *in vitro*, (5) karakterisasi dan identifikasi bakteri hasil isolasi,

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanah dan Isolasi Bakteri

Sampel tanah diambil di sekitar perakaran tanaman bambu dengan minimal kedalaman 20 cm dari permukaan tanah. Untuk menjaga viabilitas dari bakteri rizosfer, maka sampel yang telah diperoleh disimpan dalam kotak pendingin atau *cool box* pada suhu -20°C sampai saat akan dianalisis (Banna dan

Hartati, 2017). Pengambilan sampel tanah dilakukan secara acak pada 5 titik yang berbeda dengan 3 kali ulangan, kemudian dikompositkan (Nurrochman, 2015).

Sampel tanah yang sudah dikeringanginkan, diambil sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam 10 ml aquades steril, kemudian dicampur hingga homogen. Sebanyak 1 ml dari ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquades steril, kemudian dikocok hingga homogen dan 1 ml dipindahkan ke tabung berikutnya, demikian seterusnya hingga terjadi seri pengenceran $10^{-1} - 10^{-9}$. Sebanyak 100 μ l ekstrak dari masing-masing seri pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri steril berisi medium NA dan kemudian disebar rata dalam cawan petri menggunakan *stick* L. Kemudian, diinkubasi selama 24 hingga 48 jam pada suhu ruang

Pengamatan jenis bakteri dilakukan berdasarkan warna dan bentuk koloni. Tujuannya untuk mendapatkan koloni murni. Koloni bakteri yang memiliki warna dan bentuk berbeda dilakuakn purifikasi dan diinkubasi selama 2x24 jam. Kemudian diamati karakternya berupa bentuk, ukuran, warna, elevasi, permukaan, tepi dan pigmentasi.

3.4.2 Seleksi Bakteri Hasil Isolasi

a. Seleksi Penambat Nitrogen

Uji penambatan nitrogen dilakukan secara kualitatif dengan menumbuhkan semua bakteri hasil eksplorasi pada media Burk. Komposisi media Burk dapat dilihat pada Lampiran 2. Pengamatan terhadap pertumbuhan koloni bakteri dilakukan 7x24 jam setelah inkubasi. Media Burk adalah media yang mengandung garam anorganik dengan sumber karbohidrat tetapi tidak terdapat nitrogen didalamnya. Isolat yang mampu tumbuh pada media tersebut menunjukkan bahwa isolat mampu menambat nitrogen (Park *et al.*, 2004).

b. Seleksi Pelarut Fosfat

Seleksi pelarut fosfat dilakukan dengan menumbuhkan semua koloni bakteri hasil eksplorasi pada media Pikovskaya. Komposisi media Pikovskaya dapat dilihat pada Lampiran 3. Metode yang digunakan adalah metode *filter paper*. Isolat diinkubasi selama 7x24 jam pada suhu ruang. Kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat ditandai oleh terbentuknya zona bening (*halozone*) di sekitar pertumbuhan koloni (Schaad *et al.*, 2001).

c. Seleksi Antagonis Terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Seleksi bakteri antagonis merupakan suatu tahapan untuk memperoleh bakteri yang memiliki potensi sifat antagonis terhadap patogen penyakit Xoo. Bakteri yang diseleksi merupakan bakteri yang mampu tumbuh pada media Burk dan membentuk zona bening pada media Pikovskaya. Uji antagonis secara *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Hama penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian. Uji antagonis ini dilakukan terhadap bakteri hasil isolasi yang memiliki potensi sebagai PGPR dan antagonisme terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Uji antagonis ini bertujuan untuk mengetahui bakteri hasil isolasi rizosfer yang berpotensi sebagai bioprotektan terhadap penyakit hawar daun bakteri pada padi. Metode yang digunakan adalah metode *spray* atau pengkabutan (Kawaguchi *et al.*, 2006). Peubah yang diamati adalah diameter zona bening yang dihasilkan dan dihitung menggunakan rumus Wuryandari *et al.*, (2008).

3.4.3 Uji Penghambatan Terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Secara *In Vitro*

Uji antagonis secara *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Hama Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian. Uji antagonis ini dilakukan terhadap bakteri hasil isolasi yang memiliki potensi sebagai PGPR dan antagonisme terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Uji antagonis ini bertujuan untuk mengetahui bakteri hasil isolasi rizosfer yang berpotensi sebagai bioprotektan terhadap penyakit hawar daun bakteri pada padi. Metode yang digunakan adalah metode pengkabutan (Kawaguchi *et al.*, 2006). Kemudian, dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk. Pada uji antagonis dilakukan 7 perlakuan dengan 4 kali ulangan yang terdiri dari 5 perlakuan bakteri antagonis hasil isolasi, perlakuan kontrol positif dengan bakterisida berbahan aktif streptomycin sulfat dan perlakuan kontrol negatif dengan akuades steril (Tabel 1). Rancangan percobaan yang digunakan yakni Rancangan Acak Lengkap (RAL). Masing-masing perlakuan diinkubasikan selama 3x24 jam. Pengamatan indikator penghambatan dilakukan dengan mengamati zona bening yang terbentuk antara kedua bakteri yang tumbuh saat 1, 2 dan 3 HSI (hari setelah inokulasi).

Tabel 1. Perlakuan uji antagonis bakteri rizosfer terhadap Xoo

Perlakuan	Bakteri antagonis	Xoo	Streptomycin (mg/ml)	Akuades (ml)
P0	√	√	-	√
P1	√	√	-	-
P2	√	√	-	-
P3	√	√	-	-
P4	√	√	-	-
P5	√	√	-	-
P6	-	√	√	-

Keterangan : P0 (Kontrol negatif), P1 (Perlakuan 1), P2 (Perlakuan 2), P3 (Perlakuan 3), P4 (Perlakuan 4), P5 (Perlakuan 5), P6 (Kontrol positif), √ (diinokulasikan), - (tidak diinokulasikan).

3.4.4 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Hasil Isolasi

Karakterisasi dan identifikasi bakteri hasil eksplorasi dilakukan berdasarkan pada *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) (Gambar 1) dan Schaad *et al.*, (2001) (Gambar 2) untuk mengetahui genus bakteri rizosfer yang ditemukan. Berikut metode untuk identifikasi bakteri

a. Uji Hipersensitif

Uji hipersensitif bertujuan untuk mengetahui bakteri rizosfer yang di uji bersifat patogen atau tidak terhadap tanaman. Uji ini dilakukan dengan menginokulasi bakteri hasil seleksi pada tanaman tembakau. pemilihan tanaman tembakau ini didasarkan karena sifat tanaman tembakau yang sensitif terhadap patogen. Cara menginokulasinya yaitu dengan melukai daun tanaman tembakau menggunakan jarum suntik aseptik. Menurut Klement (1990), Pengujian reaksi hipersensitif dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri dari biakan yang telah diinkubasikan 48 jam. Hasil dari pengenceran tersebut diinfiltrasikan pada permukaan bawah daun tembakau yang berumur sedang. Reaksi positif terlihat jika pada bagian yang diinfiltrasi suspensi bakteri terjadi nekrosis. Pengamatan reaksi hipersensitif dilakukan selama 24 hingga 72 jam setelah inokulasi.

b. Uji Gram

Pewarnaan Gram

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri menggunakan jarum Ose yang diletakkan pada *object glass* steril yang sebelumnya telah ditetesi akuades steril 1 tetes, kemudian diekringkan diatas Bunsen. Isolat ditetesi dengan larutan kristal violet 5% sebanyak 2-3 tetes di diamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, ditetesi dengan iodine sebanyak 1-2 tetes didiamkan selama 1 menit lalu di semprot dengan alkohol 70% diamkan selama 20 detik, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Tahap terakhir yakni isolat ditetesi dengan larutan safranin 0,15 dan didiamkan selama 20 detik, dibilas dengan air mengalir. selanjutnya isolat diamati dengan mikroskop. Bakteri dengan Gram positif akan menunjukkan warna ungu dan bakteri dengan Gram negatif akan berwarna merah (Hadioetomo, 1993).

Uji KOH 3%

Isolat bakteri yang telah berumur 24 jam diambil satu ose dan diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan KOH 3% satu tetes yang kemudian diaduk dan dicampur hingga rata. Setelah rata jarum Ose diangkat perlahan-lahan. Apabila bakteri tersebut lengket atau terangkat maka bakteri tersebut bereaksi positif dan termasuk Gram negatif dan jika tidak lengket maka tergolong dalam Gram positif reaksi negatif (Lelliot dan Stead, 1987).

c. Uji Oksidatif-Fermentatif (OF)

Uji OF dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan isolat bakteri bersifat aerob ataupun anaerob. Bahan media OF (1 L aquades, 5 gr pepton, 5 gr NaCl, 0,3 gr KH_2PO_4 , 3 gr agar dan 3 ml Bromtymol Blue 1%) dilarutkan dan diatur pada pH 7,1 kemudian media dituang kedalam tabung reaksi berdiameter 13 mm sebanyak 4,5 ml per tabung. Media disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah steril, setiap tabung reaksi ditambahkan larutan glukosa sebanyak 0,5 ml.

Medium Oksidatif-Fermentatif dipersiapkan sebanyak 2 tabung reaksi untuk setiap isolat masing-masing 5 ml. Satu jarum Ose bakteri ditusukkan pada 2 medium tersebut, untuk tabung 1 ditutupi dengan minyak parafin dan tabung 2 tidak ditutupi dengan minyak parafin, kemudian masing-masing tabung

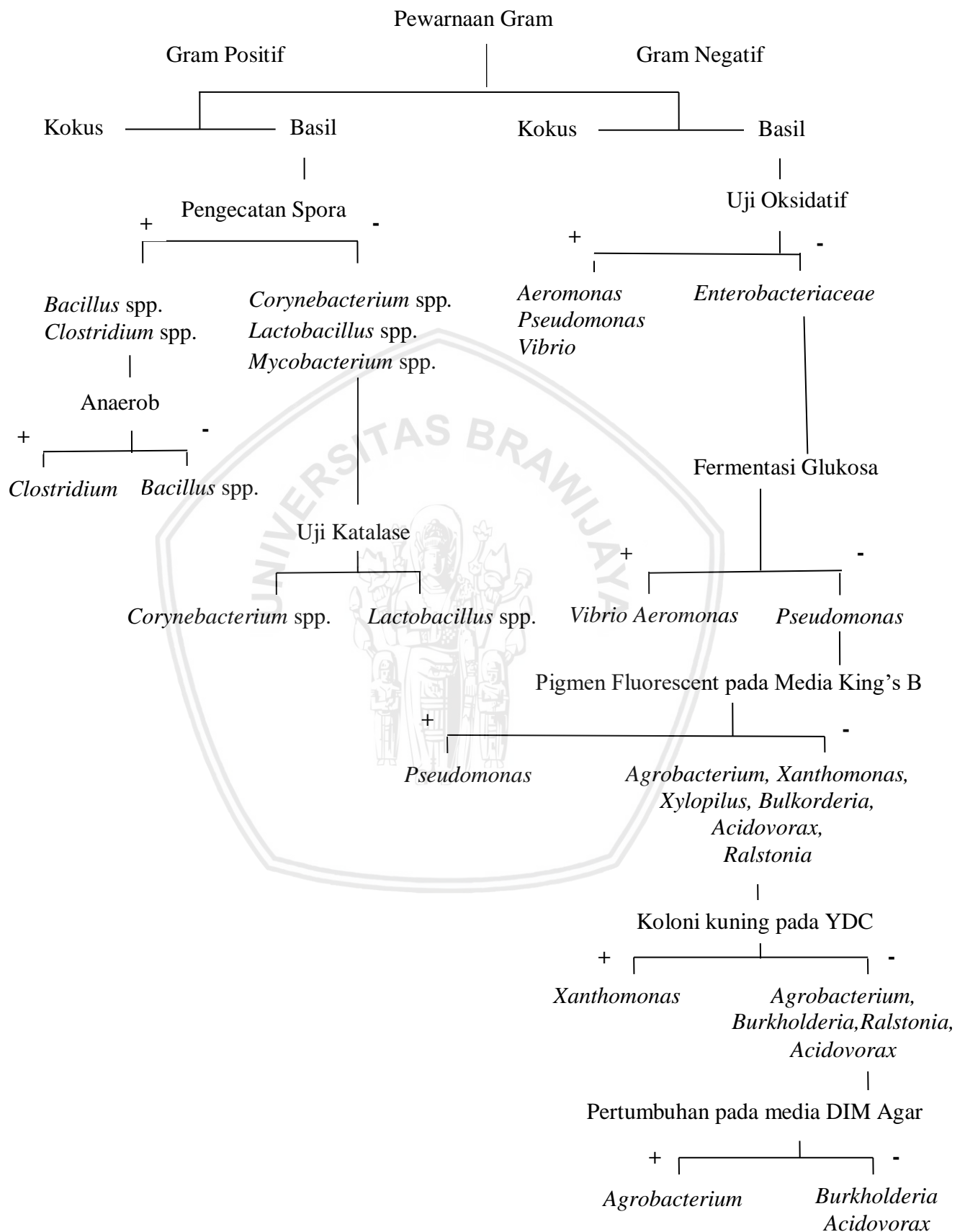
diinkubasikan selama 7-14 hari dan diamati dengan melihat perubahan warna dari hijau menjadi kuning baik pada tabung yang ditutupi parafin maupun yang tidak ditutupi parafin. Apabila seluruh media berwarna kuning maka bersifat oksidatif fermentatif (Lelliot dan Stead, 1987). Menurut Hadioetomo (1993), apabila media yang ditutupin parafin cair berubah warna maka perubahan tersebut menunjukkan reaksi fermentatif, sedangkan jika yang berubah terdapat pada tabung tanpa parafin maka menunjukkan reaksi oksidatif.

d. Uji Katalase

Biakan bakteri digoreskan pada gelas benda, kemudian ditetesi dengan H_2O_2 3%. Terjadinya gelembung udara menunjukkan bahwa bakteri mereduksi H_2O_2 (Lelliot dan Stead, 1987). Menurut Hadioetomo (1993), reaksi positif ditandai dengan adanya gelembung udara yang terbentuk karena bakteri yang diuji memiliki enzim katalase yang mampu merubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen.

f. Media Selektif YDC

Pengujian ini bertujuan untuk menyeleksi apakah bakteri yang di uji termasuk pada genus *Pantoea* atau *Erwinia*. Pengujian dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media selektif YDC. Komposisi media YDC yaitu yeast 10 gr, glukosa 20 gr, $CaCO_3$ 20 gr dan agar 15 gr dalam 1 liter aquades. Jika bakteri uji yang ditumbuhkan berwarna kuning setelah di inkubasi maka bakteri dapat digolongkan pada genus *Erwinia*.



Gambar 1. Kerangka Identifikasi Bakteri Sampai Tingkat Genus Bergey's Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001).

3.5 Variabel Pengamatan

a. Indikator Aktivitas Penambat Nitrogen dan Pelarut Fosfat

Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat dilihat dari zona bening (*halozone*) yang terbentuk di sekitar pertumbuhan bakteri pada media Pikovskaya. Sedangkan, kemampuan bakteri penambat nitrogen dilihat dari pertumbuhan koloni pada media Burk. Hasil seleksi kemudian didokumentasikan menggunakan kamera.

b. Pengamatan Zona Hambat Bakteri Antagonis Terhadap Bakteri Patogen Xoo

Zona hambat merupakan zona bening yang dihasilkan oleh bakteri antagonis sebagai bentuk perlawanan terhadap bakteri patogen. Perhitungan zona hambat dilakukan dengan mengukur jari-jari zona hambat yang terbentuk secara horizontal dan vertikal yang kemudian di jumlah dan di rata-ratakan (Pratiwi, 2005). Menurut Wuryandari *et al.*, (2008), perhitungan daya hambat dapat dilakukan menggunakan penggaris yang kemudian dihitung dengan rumus yang telah dimodifikasi yaitu :

$$R = \frac{(Dv - 0,5) + (Dh - 0,5)}{2}$$

Keterangan :

Dv : Diameter zona bening vertikal (mm)

Dh : Diameter zona bening horizontal (mm)

0,5 : Diameter koloni agens hayati

c. Pengamatan Hasil Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri

Variabel pengamatan berupa seluruh dokumentasi karakterisaasi dan identifikasi bakteri hasil seleksi dengan menggunakan kamera.

3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan dilakukan transformasi data agar sebaran yang didapatkan menjadi normal. Kemudian data akan dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan apabila terdapat perbedaan nyata akan diuji lanjut dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kesalahan 5%. Semua proses analisa data menggunakan Ms Excel.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Seleksi Bakteri Hasil Eksplorasi yang Bersifat sebagai PGPR

Berdasarkan hasil isolasi bakteri perakaran bambu pada media NA didapatkan 59 isolat bakteri yang memiliki ukuran, warna, dan bentuk yang berbeda. 59 isolat tersebut kemudian diuji potensinya sebagai PGPR pada media Burk dan media Pikovksya

a. Media Bakteri Penambat Nitrogen

Bakteri hasil purifikasi kemudian diuji pada media selektif. Salah satu media selektif untuk menguji potensi bakteri penambat nitrogen adalah media Burk. Media Burk memiliki kandungan protein Fe-Mo yang mampu mereduksi asetilen menjadi etilen yang dapat digunakan sebagai indikator proses fiksasi N₂. Sehingga bakteri yang memiliki enzim nitrogenase akan memicu proses reduksi asetilen (Buchanan *et. al.*, 2000). Berikut hasil seleksi bakteri penambat nitrogen hasil eksplorasi yang tersaji pada Tabel 2.

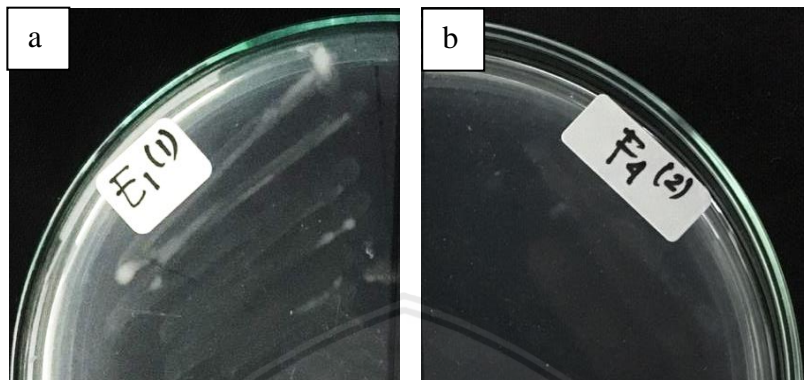
Tabel 2. Hasil seleksi bakteri penambat nitrogen pada media Burk

Kode Isolat	Hasil	Kode Isolat	Hasil	Kode Isolat	Hasil	Kode Isolat	Hasil
B1.1	+	F2.1	-	E1.2	+	C1.3	-
C1.1	-	F3.1	-	E3.2	+	C2.3	+
C2.1	+	F4.1	+	E4.2	-	C3.3	+
C3.1	-	B1.2	+	E5.2	+	C4.3	+
C6.1	+	B2.2	+	F2.2	+	D1.3	+
D1.1	+	B3.2	+	F3.2	+	D2.3	+
D2.1	+	B4.2	+	F4.2	-	D3.3	+
D3.1	+	B5.2	+	A1.3	+	D4.3	+
D4.1	+	B6.2	+	A2.3	+	E1.3	+
D5.1	-	F2.2	-	A3.3	-	E3.3	+
D6.1	-	C1.2	-	A4.3	+	F1.3	+
E1.1	+	C2.2	+	B1.3	+	F2.3	+
E2.1	+	C3.2	-	B2.3	+	F3.3	+
E3.1	+	C4.2	+	B3.3	+	F4.3	+
F1.1	-	D1.2	+	B4.3	+		

Keterangan : (+) tumbuh, (-) tidak tumbuh

Hasil seleksi bakteri penambat nitrogen menunjukkan bahwa 76% atau 45 dari 59 isolat mampu tumbuh pada media Burk. Menurut Asniah (2013), apabila

isolat mampu tumbuh pada media Burk, maka bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk mengikat nitrogen bebas bagi pertumbuhannya (Gambar 3a). Pertumbuhan bakteri pada media Burk dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pertumbuhan bakteri pada media Burk a. Bakteri penambat nitrogen yang tumbuh pada media Burk, b. Bakteri yang tidak tumbuh pada media Burk.

b. Media Bakteri Pelarut Fosfat

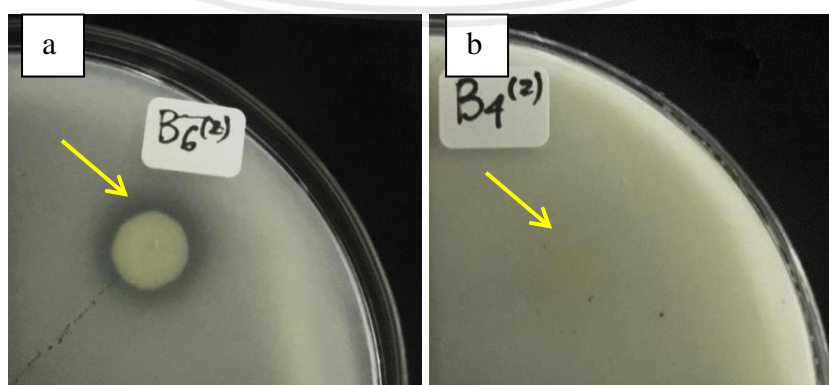
Seleksi bakteri yang mempunyai sifat PGPR salah satunya dapat diketahui dari kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Metode yang banyak digunakan adalah dengan menumbuhkan bakteri pada media Pikovskaya. Media Pikovskaya memiliki kandungan Ca_3HPO_4 sebagai sumber fosfat sehingga media ini digunakan sebagai media selektif bagi bakteri pelarut fosfat. Menurut Asniah (2013), untuk menguji kemampuan rizobakteri dalam melarutkan fosfat digunakan media uji *Pikovskaya's agar* dengan penambahan *tricalcium phosphate* (TCP) sebagai sumber fosfat. Bakteri pada media Pikovskaya mampu melarutkan Ca_3HPO_4 menjadi ortofosfat. Menurut Thakuria *et al.*, (2004), kemampuan bakteri melarutkan fosfat dari isolat yang diuji dievaluasi secara kualitatif berdasarkan terbentuknya halo di sekitar bakteri. Asniah (2013), mengatakan bahwa semakin tinggi diameter halo yang dihasilkan, kemampuan rizobakteri pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat juga tinggi. Berikut hasil seleksi bakteri pelarut fosfat hasil eksplorasi yang tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil seleksi bakteri pelarut fosfat pada media Pikovskaya

Kode Isolat	Hasil	Kode Isolat	Hasil	Kode Isolat	Hasil	Kode Isolat	Hasil
B1.1	+	F2.1	+	E1.2	+	C1.3	+
C1.1	+	F3.1	+	E3.2	+	C2.3	+
C2.1	+	F4.1	+	E4.2	+	C3.3	-
C3.1	-	B1.2	-	E5.2	-	C4.3	+
C6.1	+	B2.2	-	F2.2	-	D1.3	+
D1.1	+	B3.2	-	F3.2	-	D2.3	+
D2.1	+	B4.2	-	F4.2	-	D3.3	+
D3.1	+	B5.2	+	A1.3	+	D4.3	+
D4.1	+	B6.2	+	A2.3	+	E1.3	+
D5.1	+	F2.2	+	A3.3	+	E3.3	+
D6.1	+	C1.2	+	A4.3	+	F1.3	+
E1.1	+	C2.2	+	B1.3	+	F2.3	+
E2.1	+	C3.2	-	B2.3	+	F3.3	+
E3.1	+	C4.2	+	B3.3	+	F4.3	+
F1.1	+	D1.2	+	B4.3	+		

Keterangan : (+) menghasilkan zona bening, (-) tidak menghasilkan zona bening

Hasil seleksi bakteri pelarut fosfat menunjukkan bahwa 81% atau 48 isolat dari 59 isolat mampu tumbuh pada media Pikovskaya. Bakteri yang bersifat sebagai pelarut fosfat memiliki indikator zona bening (*halozone*) (Gambar 4a). Sedangkan bakteri yang bukan pelarut fosfat tidak menghasilkan zona bening (Gambar 4b). Pengujian pertumbuhan bakteri pelarut fosfat dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pertumbuhan bakteri pada media Pikovskaya dengan masa inkubasi 72 jam a. Bakteri menghasilkan zona bening, b. Bakteri tidak menghasilkan zona bening

4.2 Hasil Seleksi Bakteri PGPR sebagai Agens Antagonis Terhadap Patogen

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*

Berdasarkan hasil seleksi media Burk dan media Pikovskaya terdapat 37 bakteri yang merupakan bakteri penambat nitrogen dan pelarut fosfat. Kemudian, 37 bakteri tersebut di uji sebagai agens antagonis terhadap patogen penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* atau Xoo. Berikut hasil pengujian agens antagonis pada 37 bakteri hasil seleksi media Burk dan media Pikovskaya yang tersaji dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji agens antagonis 37 bakteri terhadap patogen Xoo

Kode Isolat	Zona Bening (mm)	Kode Isolat	Zona Bening (mm)	Kode Isolat	Zona Bening (mm)	Kode Isolat	Zona Bening (mm)
B1.1	-	B5.2	-	B1.3	-	E1.3	-
C2.1	-	B6.2	10	B2.3	-	E3.3	-
C6.1	-	F2.1	-	B3.3	-	F1.3	-
D1.1	-	C2.2	-	B4.3	-	F2.3	-
D2.1	-	D1.2	-	C2.3	-	F3.3	-
D3.1	-	E1.2	-	C4.3	-	F4.3	-
D4.1	-	E3.2	6,5	D1.3	-		
E1.1	3,5	A1.3	3,0	D2.3	-		
E2.1	-	A2.3	-	D3.3	-		
F4.1	-	A4.3	3,0	D4.3	-		

Keterangan : (-) reaksi negatif

Hasil pengujian antagonis dengan Xoo didapatkan 5 bakteri isolat yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan zona hambat yang berwarna bening. Menurut Hermawan (2007), zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri. Zona hambat yang dihasilkan memiliki ukuran berbeda-beda. Kelima isolat tersebut dipilih untuk digunakan pada uji selanjutnya.

4.3 Hasil Uji Antagonis *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secara *in vitro*

Berdasarkan hasil seleksi sifat antagonis isolat bakteri hasil isolasi terhadap Xoo maka, diperoleh 5 bakteri dengan nilai zona hambat yang berbeda-beda. Kelima bakteri yang dipilih sebagai bahan perlakuan memiliki kode isolat B6.2, E3.2, E1.1, A1.3, dan A4.3. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan zona hambat bakteri hasil seleksi terhadap Xoo menunjukkan adanya

pengaruh nyata (Lampiran 1). Kemudian, dilakukan uji lanjut DMRT dengan taraf 5%. Rerata indeks penghambatan hasil uji antagonis Xoo dengan bakteri hasil seleksi dapat dilihat pada Tabel 5.

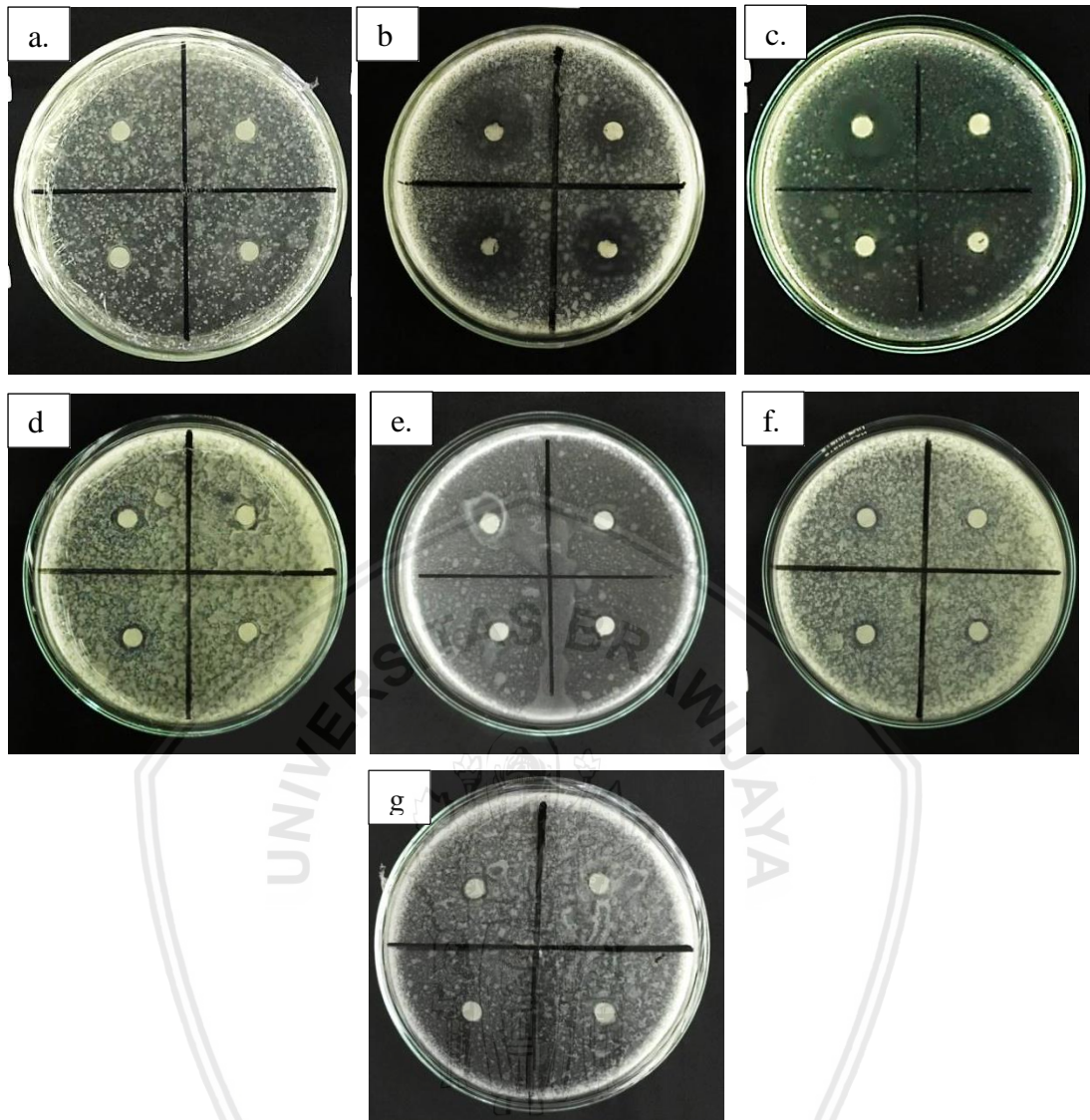
Tabel 5. Hasil uji rerata indeks penghambatan bakteri hasil seleksi dengan patogen Xoo

No.	Perlakuan	Rerata Indeks Penghambatan		
		1 HSI	2 HSI	3 HSI
1	Akuades	0,00 a	0,00 a	0,00 a
2	Streptomisin	14.25 c	14.13 c	12.50 c
3	Isolat B6.2	5.25 b	5.13 b	5.13 b
4	Isolat E1.1	1.86 ab	1.75 ab	1.76 ab
5	Isolat E3.2	3.75 b	3.30 ab	3.38 ab
6	Isolat A4.3	2.25 ab	1.88 ab	1.87 ab
7	Isolat A1.3	1.75 ab	1.50 ab	1.50 ab

Keterangan : - Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.
 - Data ditransformasi menggunakan $\sqrt{x + 0,5}$ untuk keperluan analisis.

Berdasarkan hasil pengamatan hingga 3 HSI dapat diketahui bahwa zona bening yang dihasilkan antar perlakuan berbeda-beda. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diameter zona bening dari 1 HSI menuju 2 HSI mengalami penurunan. Namun, pada pengamatan 2 HSI menuju 3 HSI menunjukkan diameter zona bening yang dihasilkan cenderung sama dengan pengamatan 2 HSI, kecuali pada perlakuan streptomisin yang mengalami penurunan. Adanya penurunan rerata diameter zona hambat menunjukkan bahwa bakteri antagonis bersifat bakteristatik atau menghambat sementara. Menurut Madigan *et al.*, (2000), bakteristatik adalah sifat antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, bersifat sementara (*reversible*). Senyawa bakteristatik seringkali bekerja dengan menghambat sintesis protein atau mengikat ribosom.

Perlakuan yang diujikan terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif, dan bakteri hasil seleksi. Pada perlakuan akuades sebagai kontrol negatif menunjukkan tidak ada aktivitas penghambatan dengan tidak terbentuknya zona bening. Sedangkan, pada perlakuan streptomisin sebagai kontrol positif menunjukkan adanya aktivitas penghambatan dengan terbentuknya zona bening. Kelima bakteri hasil eksplorasi menunjukkan adanya aktivitas penghambatan dengan terbentuknya zona bening (Gambar 5).



Gambar 5. Zona bening yang dihasilkan bakteri hasil uji antagonis terhadap Xoo pada 3 HSI a. Kontrol negatif b. Kontrol positif c. Bakteri isolat kode B6.2, d. Bakteri isolat kode E1.1, e. Bakteri isolat kode E3.2, f. Bakteri isolat kode A4.3, g. Bakteri isolat kode A1.3

Berdasarkan hasil uji lanjut pada pengamatan 3 HSI, kelima bakteri yaitu bakteri dengan kode B6.2, E3.2, E1.1, A1.3, dan A4.3 memiliki luas zona hambat yang tidak berbeda nyata. Namun, bakteri dengan kode isolat B6.2 memiliki luas zona hambat yang berbeda nyata dengan perlakuan kontrol akuades dan streptomisin. Variasi diameter zona bening yang terbentuk diduga karena adanya perbedaan daya antagonis dan senyawa antagonis yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Penurunan dan peningkatan pada indeks penghambatan juga bergantung pada karakteristik atau faktor genetik bakteri. Semakin besar zona

bening yang terbentuk, maka semakin besar kemampuan dalam menekan pertumbuhan patogen. Menurut Hallman *et al.*,(1997), penghambatan bakteri antagonis terhadap patogen dilakukan dengan mengeluarkan senyawa antibiotik dan kompetisi yang terjadi dalam ruang dan nutrisi.

4.4 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Hasil Isolasi

4.4.1 Karakterisasi Bakteri Hasil Seleksi

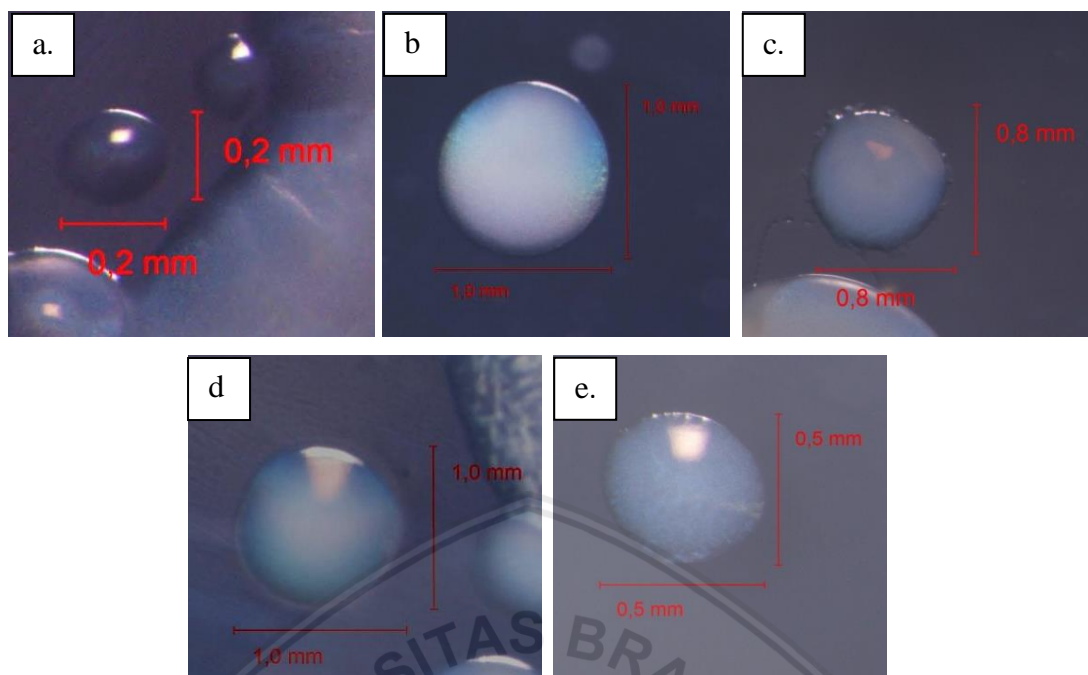
Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi dilakukan terhadap 5 isolat bakteri yang telah lolos tahap seleksi bakteri penambat nitrogen, pelarut fosfat dan bakteri antagonis terhadap patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Pengamatan yang dilakukan meliputi morfologi koloni dan morfologi sel. Hasil pengamatan terhadap morfologi bakteri dilakukan dibawah mikroskop dengan hasil karakteristik yang tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik morfologi bakteri hasil seleksi

Kode Isolat	Morfologi koloni					Morfologi sel	
	Bentuk	Warna	Tepi	Mukoid	Elevasi	Bentuk	Gram
B6.2	Lonjong	Putih keruh	Rata	Ada	Cembung	Batang	Negatif
E1.1	Bulat	Putih	Rata	Ada	Cembung	Batang	Negatif
E3.2	Bulat	Putih	Rata	Ada	Cembung	Batang	Negatif
A1.3	Bulat	Putih	Rata	Ada	Cembung	Batang	Negatif
A4.3	Lonjong	Putih	Rata	Ada	Cembung	Batang	Negatif

Berdasarkan pengamatan morfologi koloni yang meliputi bentuk koloni, warna, tepi dan elevasi didapatkan hasil yang berbeda antar beberapa isolat. Pada pengamatan morfologi sel yang meliputi pengamatan mukoid, bentuk, dan identifikasi Gram menunjukkan bahwa seluruh isolat yang di karakterisasi memiliki mukoid, berbentuk batang dan merupakan Gram negatif. Gambar koloni tunggal hasil pengamatan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil karakterisasi morfologi koloni bakteri agens antagonis hasil eksplorasi a. Bakteri isolat kode B6.2, b. Bakteri isolat kode E1.1, c. Bakteri isolat kode E3.2, d. Bakteri isolat kode A1.3, e. Bakteri isolat kode A4.3.

Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia

Pengujian fisiologi dan biokimia terhadap bakteri hasil isolasi terdiri dari beberapa tahapan identifikasi yaitu uji hipersensitif, uji Gram yang terdiri dari pewarnaan Gram dan pengujian dengan KOH 3%, uji oksidatif fermentatif, pertumbuhan bakteri dengan media YDC dan uji katalase. Hasil pengujian isolat bakteri hasil seleksi dapat dilihat pada Tabel 5.

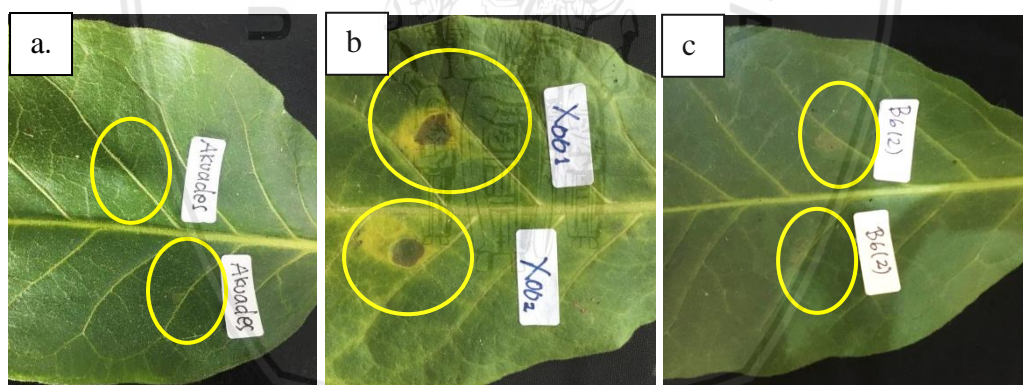
Tabel 5. Karakteristik fisiologi dan biokimia isolat bakteri hasil seleksi

Karakter	Isolat B6 (2)	Isolat E1 (1)	Isolat E3 (2)	Isolat A1 (3)	Isolat A4 (3)
Uji hipersensitif	-	-	-	-	-
Uji reaksi Gram :					
a. Pewarnaan Gram	-	-	-	-	-
b. KOH 3%	-	-	-	-	-
Uji Oksidatif-Fermentatif	F	F	F	F	F
Warna koloni pada media YDC	Kuning	Putih	Kuning	Putih	Putih
Uji katalase	+	+	+	+	+
Genus	<i>Pantoea</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Erwinia</i>

Keterangan : (+) reaksi positif, (-) reaksi negatif, (F) fermentative

1. Uji Hipersensitif

Terdapat rangkaian tahapan dalam proses karakterisasi bakteri isolat yang dimulai dengan uji hipersensitif. Uji hipersensitif bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut bersifat patogenik bagi tanaman atau tidak. Pengujian ini diulang sebanyak 2 kali. Berdasarkan pengamatan uji hipersensitif selama 3 hari, bakteri isolat dan inokulasi akuades tidak menimbulkan gejala nekrosis atau memiliki respon negatif pada daun tanaman tembakau (Lampiran 6). Sehingga, dapat diketahui bahwa bakteri isolat tidak bersifat patogenik bagi tanaman. Pengujian Xoo pada daun tembakau menunjukkan respon nekrosis (Gambar 7b) Menurut Agrios (2004), jika bakteri yang diinokulasikan pada daun tanaman tembakau tidak menimbulkan gejala nekrosis maka bakteri tersebut tidak bersifat patogenik terhadap tanaman. Sebaliknya, jika bakteri yang diinokulasikan pada daun tanaman tembakau menimbulkan gejala nekrosis maka bakteri tersebut bersifat patogenik bagi tanaman. Umumnya, gejala nekrosis akan muncul tiga hingga satu minggu setelah inokulasi bakteri pada daun tembakau.



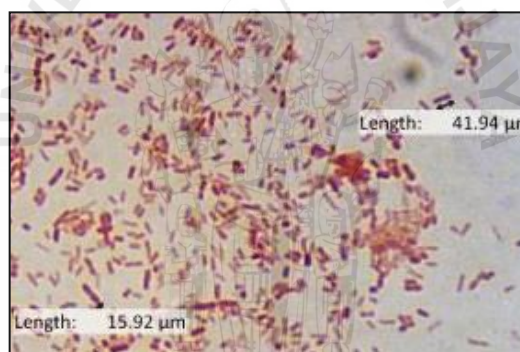
Gambar 7. Hasil uji hipersensitif bakteri agens antagonis hasil eksplorasi pada daun tembakau pada 3 HSI a. Kontrol negatif akuades, b. Kontrol positif patogen Xoo c. Bakteri isolat kode B6.2.

2. Uji reaksi Gram

Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut termasuk kedalam Gram positif atau Gram negatif. Hasil pengujian pewarnaan Gram menunjukkan 5 isolat bakteri yang diidentifikasi berwarna merah dan berbentuk basil (Lampiran 7). Sehingga, dapat dikatakan bahwa bakteri isolat

merupakan Gram negatif. Berdasarkan Brenner *et al.*, (2005) jika hasil pewarnaan Gram menunjukkan warna ungu maka bakteri tergolong ke dalam bakteri Gram positif. Jika hasil pewarnaan Gram menunjukkan warna merah maka bakteri tergolong ke dalam Gram negatif. Pewarnaan Gram pada bakteri Gram positif akan mempertahankan zat berwarna kristal violet yang tampak berwarna ungu tua di bawah mikroskop. Sedangkan Gram negatif akan kehilangan zat pewarna kristal violet setelah di cuci dengan alkohol dan saat diberi zat pewarna lainnya atau safranin akan tampak berwarna merah (Gambar 8). Sel bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan yang tebal. Sedangkan bakteri Gram negatif terdiri dari kandungan lipid yang tinggi dibandingkan dengan bakteri Gram positif, sehingga pada pewarnaan Gram akan menunjukkan warna yang berbeda antara Gram negatif dan positif yang disebabkan oleh perbedaan struktur kimiawinya (Pelezar dan Chan, 1988).

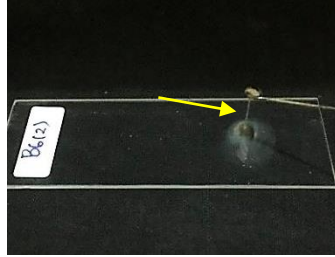


Gambar 8. Hasil pewarnaan Gram bakteri agens antagonis hasil eksplorasi dengan perbesaran 100x pada bakteri isolat kode B6.1.

Uji KOH 3%

Hasil uji KOH 3% menunjukkan bahwa 5 isolat bakteri yang diidentifikasi bereaksi positif dengan mengeluarkan lendir saat ditetesi dengan KOH 3% (Lampiran 8). Berdasarkan Schaad *et al.*, (2001), uji bakteri terhadap KOH 3% bakteri Gram negatif tampak berlendir, lengket dan seperti benang saat jarum Ose diangkat. Jika Gram positif tidak tampak adanya lendir, encer dan tidak terangkat oleh jarum Ose ketika diangkat. Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis. Sedangkan Gram negatif memiliki dinding sel yang tipis dan lemak yang tebal. Senyawa KOH akan menyerang lemak (*bilayer lipid*) dan membuat sel Gram negatif pecah. Pecahnya sel akan melepaskan materi

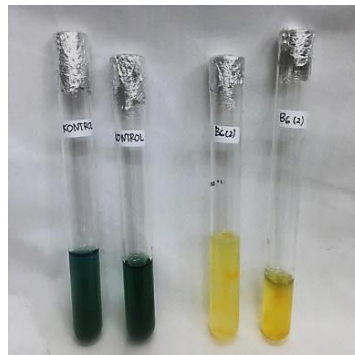
genetik yang merupakan substansi melimpah pada bakteri. Molekul DNA yang sangat panjang dan bersifat *sticky string* (menyerupai lendir, getah dan lengket) memberikan efek seperti lendir saat diangkat dengan jarum Ose (Gambar 9).



Gambar 9. Hasil uji KOH 3% bakteri hasil eksplorasi pada isolat B6.

3. Uji Oksidatif Fermentatif

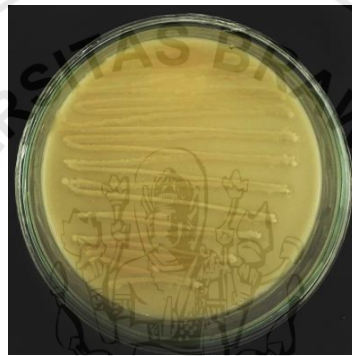
Uji ini bertujuan untuk mengetahui metabolisme pada bakteri yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media selama masa inkubasi yaitu 1 minggu. Hasil uji menunjukkan bahwa 5 media isolat bakteri berubah warna menjadi kuning baik pada tabung yang tertutupi oleh *water agar* ataupun tidak (Lampiran 9). Berubah warnanya kedua tabung tersebut menunjukkan sifat Fermentatif. Berdasarkan Schaad *et al.*, (2001), jika terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning pada tabung media, maka mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob (terjadi fermentasi atau bersifat fermentatif). Sedangkan jika tidak terjadi perubahan warna biru mengindikasikan negatif untuk pertumbuhan anaerob (tidak terjadi fermentasi atau bersifat oksidatif). Sehingga, dapat dikatakan bahwa bakteri isolat memiliki sifat anaerob atau fermentative (Gambar 10).



Gambar 10. Hasil uji Oksidatif-Fermentatif bakteri B6.2 yang bersifat Fermentatif.

4. Pertumbuhan pada media YDC

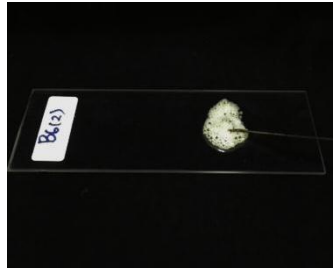
Berdasarkan pada diagram Schaad *et al.*, (2001), jika hasil uji fermentatif oksidatif menunjukkan reaksi fermentatif maka selanjutnya adalah uji pada media YDC. Jika pengujian pada media YDC menunjukkan warna koloni putih maka tergolong dalam genus *Erwinia* sp. Sedangkan jika berwarna kuning maka tergolong ke dalam genus *Pantoea* sp (Gambar 11). Hasil pengujian menunjukkan 3 isolat yaitu E1.1, A1.3 dan A4.3 memiliki koloni berwarna putih yang menunjukkan genus *Erwinia* sp. Sedangkan 2 isolat lainnya yaitu B6.2 dan E3.2 memiliki warna koloni kuning pada media YDC yang menunjukkan genus *Pantoea* sp (Lampiran 10).



Gambar 11. Kenampakan morfologi warna kuning pada koloni bakteri B6.2 pada media YDC.

5. Uji Katalase

Uji katalase merupakan pengujian untuk mengetahui bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim katalase atau tidak. Enzim tersebut merupakan katalisator dalam penguraian hydrogen-peroksida (H_2O_2) untuk menghasilkan oksigen dan air. Menurut Lay (1994), timbulnya gelembung-gelembung gas pada pada uji katalase membuktikan bahwa bakteri mampu menghasilkan enzim katalase sehingga mampu merubah H_2O_2 menjadi oksigen dan air (Gambar 12). Hasil uji katalase menunjukkan 5 isolat bakteri mampu menghasilkan gelembung-gelembung gas (Lampiran 11). Sehingga dapat dikatakan bahwa 5 isolat bakteri memiliki enzim katalase yang mengubah H_2O_2 menjadi oksigen dan air.



Gambar 12. Hasil uji katalase isolat bakteri B6.2 yang bereaksi positif.

4.4.2 Identifikasi Bakteri Agens Antagonis

Bakteri hasil seleksi yang berjumlah 5 kemudian diidentifikasi berdasarkan pada pengamatan karakterisasi morfologi koloni, fisiologi dan biokimia. Identifikasi dilakukan hingga tingkat genus yang didasarkan pada Schaad *et al.*, (2001) (Gambar 2) dan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) (Gambar 1). Berikut hasil identifikasi 5 bakteri hasil seleksi

1. Isolat B6.2

Isolat dengan kode B6.2 memiliki bentuk lonjong, warna putih keruh, tepian rata, elevasi cembung, dan terdapat mukoid. Berdasarkan pengujian fisiologis dan biokimia bakteri tersebut berbentuk batang dan Gram negatif, bersifat Fermentatif, memiliki koloni berwarna kuning pertumbuhan pada media YDC, dan beraksi positif pada pengujian katalase. Berdasarkan diagram Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001), bakteri dengan karakter tersebut merupakan bakteri dengan genus *Pantoea* sp.

2. Isolat E3.2

Isolat dengan kode E3.2 memiliki bentuk bulat, warna putih, tepian rata, elevasi rata, dan terdapat mukoid. Berdasarkan pengujian fisiologis dan biokimia bakteri tersebut berbentuk batang dan Gram negatif, bersifat Fermentatif, memiliki koloni berwarna kuning pertumbuhan pada media YDC, dan beraksi positif pada pengujian katalase. Berdasarkan diagram Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001), bakteri dengan karakter tersebut merupakan bakteri dengan genus *Pantoea* sp.

3. Isolat E1.1

Isolat dengan kode E1.1 memiliki bentuk bulat, warna putih, tepian rata, elevasi cembung, dan terdapat mukoid. Berdasarkan pengujian fisiologis dan bikomia bakteri tersebut berbentuk batang dan Gram negatif, bersifat Fermentatif, memiliki koloni berwarna putih pertumbuhan pada media YDC, dan beraksi positif pada pengujian katalase. Berdasarkan diagram Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001), bakteri dengan karakter tersebut merupakan bakteri dengan genus *Erwinia* sp.

4. Isolat A1.3

Isolat dengan kode A1.3 memiliki bentuk bulat, warna putih, tepian rata, elevasi cembung, dan terdapat mukoid. Berdasarkan pengujian fisiologis dan bikomia bakteri tersebut berbentuk batang dan Gram negatif, bersifat Fermentatif, memiliki koloni berwarna putih pertumbuhan pada media YDC, dan beraksi positif pada pengujian katalase. Berdasarkan diagram Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001), bakteri dengan karakter tersebut merupakan bakteri dengan genus *Erwinia* sp.

5. Isolat A4.3

Isolat dengan kode A4.3 memiliki bentuk lonjong, warna putih, tepian rata, elevasi cembung, dan terdapat mukoid. Berdasarkan pengujian fisiologis dan bikomia bakteri tersebut berbentuk batang dan Gram negatif, bersifat Fermentatif, memiliki koloni berwarna putih pertumbuhan pada media YDC, dan beraksi positif pada pengujian katalase. Berdasarkan diagram Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001), bakteri dengan karakter tersebut merupakan bakteri dengan genus *Erwinia* sp.

4.5 Pembahasan Umum

Berdasarkan hasil identifikasi 5 isolat bakteri yang ditemukan terdiri dari genus *Pantoea* dan *Erwinia*. Isolat dengan kode B6.2 dan E3.2 merupakan bakteri dengan genus *Pantoea*. Sedangkan, bakteri dengan kode isolat E1.1, A1.3 dan A4.3 merupakan bakteri dengan genus *Erwinia*. Menurut Glick (1995), PGPR dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman secara langsung ataupun tidak langsung. Pengaruh langsung PGPR didasarkan atas kemampuannya menyediakan

atau menyerap unsur hara dalam tanah dan mensintesis serta mengubah konsentrasi berbagai fitohormon pemacu pertumbuhan tanaman. Sedangkan pengaruh tidak langsung PGPR berkaitan dengan kemampuannya menekan aktivitas patogen dengan cara menghasilkan metabolit seperti antibiotik dan siderofor.

Kelima bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif yang mampu menambat nitrogen dan melarutkan fosfat. Menurut Glick (1995), berbagai jenis bakteri telah diidentifikasi sebagai PGPR sebagian besar berasal dari kelompok gram-negatif salah satunya berasal dari genus *Erwinia*. Selain itu, beberapa bakteri dari genus *Erwinia* ini juga mampu menghasilkan hormon IAA (*Indole Acetic Acid*). Menurut Grobelak *et al.*, (2015), *Erwinia* sp. mampu menghasilkan hormon IAA dan melarutkan fosfat serta memacu pertumbuhan tanaman secara signifikan. Moustaine *et al.*, (2016), menambahkan bahwa bakteri *Erwinia* sp. mampu mempengaruhi jumlah klorofil dan menstimulasi aktivitas fotosintesis pada tanaman gandum karena menghasilkan enzim ACC (*1-aminocyclopropane-1-carboxylate*). Menurut Husein (2011), enzim ACC deaminase ini mampu mengendalikan biosintesis hormon etilen yang biasanya diproduksi tanaman secara berlebihan saat tanaman tercekam. Peningkatan konsentrasi hormon etilen pada awal pertumbuhan vegetatif menghambat pertumbuhan dan perkembangan perakaran.

Bakteri yang mampu memacu pertumbuhan tanaman selanjutnya adalah *Pantoea* sp. Bakteri ini mampu memacu pertumbuhan tanaman melalui produksi IAA, melarutkan fosfat dan menambat nitrogen. Damam *et al.*, (2014), melaporkan bahwa *Pantoea* sp. mampu meningkatkan total berat biomassa melalui produksi faktor pengatur pertumbuhan dan kemampuan melarutkan fosfat. Selain itu, menurut Dastager *et al.*, (2009), *Pantoea* sp. juga mampu memacu pertumbuhan tanaman melalui aktivitas pelarutan fosfat, produksi IAA, produksi siderofor dan produksi HCN.

Kedua genus bakteri ini juga memiliki potensi sebagai agens antagonis. Hasil penelitian Kearns (1993), menunjukkan bahwa bakteri genus *Erwinia* yang diisolasi dari tanaman angrek mampu menghambat patogen *Erwinia amylovora* penyebab *fire blight* pada tanaman apel dan pir. Wright *et al.*, (2001) juga

melaporkan bahwa bakteri genus *Pantoea* yaitu *Pantoea angglomerans* bersifat antagonis terhadap *Erwinia amylovora* yang menyerang pohon apel. Pengendalian ini juga efektif untuk mengendalikan patogen pasca panen. Menurut Fitriani *et al.*, (2014), *Pantoea* sp. mampu menghasilkan metabolit sekunder berupa antibakteri dengan gugus kimia N-methyl-N-[2'-(4-pyridyl)ethylamine,N-methyl-N-[2'-(4-pyridylethyl)-(2(2pyridil) ethylamine.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil isolasi telah diperoleh 59 isolat bakteri yang memiliki bentuk, warna dan ukuran berbeda. Hasil seleksi menunjukkan 45 isolat bersifat sebagai penambat nitrogen, 48 isolat pelarut fosfat dan 37 isolat yang memiliki sifat keduanya. Dari 37 isolat tersebut, 5 diantaranya memiliki potensi antagonis terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
2. Kelima isolat dengan kode B6.2, E3.2, E1.1, A1.3 dan A4.3 mampu menambat nitrogen, melarutkan fosfat dan bersifat antagonis terhadap Xoo. Hasil uji antagonis menunjukkan zona hambat yang dihasilkan dari kelima bakteri terhadap Xoo tidak berbeda nyata.
3. Hasil identifikasi secara morfologi, fisiologi dan biokimia terhadap 5 isolat bakteri terpilih yaitu isolat dengan kode B6.2 dan E3.2 merupakan bakteri dari genus *Pantoea* sp. Bakteri dengan kode isolat E1.1, A1.3, A4.3 merupakan bakteri dari genus *Erwinia* sp.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi bakteri rizosfer sebagai PGPR dan potensi antagonis terhadap Xoo secara *in vivo* pada skala rumah kaca. Kemudian, perlu dilaksanakan penelitian efektivitas konsorsium bakteri dalam menstimulasi pertumbuhan tanaman dan potensi bakteri konsorsium sebagai agens anntagonis Selain itu, untuk menyempurnakan hasil penelitian ini maka perlu dilakukan identifikasi secara molekuler terhadap 5 isolat bakteri yang telah diidentifikasi hingga tingkat spesies.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, B. 2006. Potensi Padi Liar sebagai Sumber Genetik dalam Pemuliaan Padi. IPTEK Tanaman pangan No. 2: 143-152.
- Agrios G. N. 2005. Plant Pathology Fifth Edition. Elsevier Academic Press. San Diego California.
- Akhtar, A., Hisamuddin, Robab M. I., Abbasi dan Sharf R. 2012. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: An overview. Jurnal National. Production Plant Resources 2(1): 19-31.
- Aryantha, I.P., Lestari D. P., dan Pangesti N. P. 2004. Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA dalam Meningkatkan Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau pada Kondisi Hidroponik. J Mikrobiol Indones. 9:43-46.
- Asniah, Rakian T. C., Wangadi S. dan Gusnawaty. 2013. Karakterisasi Biokimiawi Rizobakteri Asal Gulma Berdaun Lebar yang Berpotensi Sebagai *Deleterious Rhizobacteria*. Jurnal Agroteknos 3(3) : 179-183.
- Batubara, Umami M., Ika O. S. dan Hesti R. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Indigenous Kawasan Kampus Universitas Jambi. Prosiding Semirata 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat Universitas Tanjungpura Pontianak. Hal 243 – 250.
- Beneduzi, A., Ambrosini A. and Passaglia. 2012. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Their Ptentian as Antagonists and Biocontrol Agents. Genetics and Molecular Biology 35(4): 1044-1051.
- Buchanan, B., Gruissem, W., dan Jones, R. 2000 Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD
- BPOPT. 2007. Pengembangan dan Pemnafaatan *Corynebacterium* untuk Pengendalian Penyakit Utama Tanaman Padi Skala Luas. [Online] Available at : <http://bbopt.tanamanpangan.pertanian.go.id/artikelku/artikelteknologi/37-corine-bacterium>. [Diakses pada 28 November 2018].
- BPTP. 2016. Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Tanaman Padi. [Online] Avalaible at : <http://pangan.litbang.pertanian.go.id/berita-748-penyakit-hawar-daun-bakteri-pada-tanaman-padi.html>. [Diakses pada 28 November 2018].
- Brenner, D. J., Krieg N. R., Staley J. T. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Vol 2 Springer . New York.
- Dali, S., Natsir, Usman H. dan Ahmad A. 2011. Bioaktivitas Antibakteri Fraksi protein Alga Merah Gelidium amansii dari Perairan Cikoang Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. 15 (1):47–52
- Damam, M., Gaddam B., Kausar R. 2014. Effect of Plant Growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on *Coleus forskholii*. Int. J. Curr. Microbiology 3 (9): 266-274.

- Darma, R., Maria P., Delia A., Theodorus E. P., Maria S. and Antonius S. 2016. A Strong Antifungal-producing bacteria from Bamboo Powder for Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in Melon. J Plant Pathol Microbiol Vol. 7 (2): 1-7.
- Dastager S.G., Deepa C.K., Puneet S.C., Nautiyal C.S., Pandey A. 2009. Isolation and characterization of plant growth-promoting strain Pantoea NII-186. From Western Ghat forest soil, India. Lett. Appl. Microbiol., 49(1): 20-25.
- Degrasi, G., Devescovi G., Bigirimana J., and V. Venturi. 2010. *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. XKK.12 Contains and Aro Qy chorismate Mutase that is Involved in Rice Virulence. J. Phytopathology 100: 262-270.
- Dewi, R. I. 2007. Rhizobacteria Pendukung Pertumbuhan Tanaman. Makalah Jurusan Budidaya Tanaman. Fakultas Pertanian. Universitas Padjajaran.
- Fitriani, A., Riandi Rita S., dan Any A. 2014. Anti Quorum Sensing supernatant Bakteri Endofit Akar *Vetivera zizanioides* L.FMIPA. Universitas Pendidikan Indonesia.
- Freeman, S., Zveibel A., Vintal H., Maymon M. 2002. Isolation of Nonpathogenic Mutans of *Fusarium oxysporum* f sp. *melonis* for Biological Control of Fusarium Wilt in Curcubitae. J. Phytopatology vol. 1 (92): 264-168.
- Gao, F., Dai C., Liu X. 2010. Mechanism of Fungal Endophytes in Plant Protection Gaints Patogen. African J. of Microbiology Reaserch Vol 4 (13): 1346-1351.
- Glick, B. R. 1995. The Enhancement of Plant Growth by Free Living Bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41 (2): 109-117.
- Gnanamanickam, Priyadarisini S. S., Narayanan V. B., Vasudevan N. N, and Kavitha S. 1999. An Overview of Bacterial Blight Disease of Rice and Strategies for its Management. J. Curent Science, 77 : 1435-1443.
- Grobelak, A., Napora A. and Kacprzak M. 2015. Using Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Improve Plant Growth. Ecological Engineering (84): 22-28.
- Habazar, T., dan Yaerwandi. 2006. Pengendalian Hayati Hama dan Penyakit Tumbuhan. Andalas University Press. Padang.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Jakarta : Gramedia.
- Haggag, W.M. and Mohamed H. A. A. 2007. Biotechnological Aspects of Microorganism Used in Plant Biological Control. Am-Eurasian Journal Sustainable Agriculture 1: 7-12.
- Hallman, J., Quadt A., Mahaffe W. F., Kloepper J. W. 1997. Bacterial Endophytes in Agricultural Crop. J Microbial (43) : 895-914.
- Hammerschmidt, R. and Dann E. K. 2000. Induced Resistance to Disease. Environmentally Safe Approach to crop Disease Control. Chapter 8 . Lewish Pubhliser, Boca Raton. p 177-194.
- Handayanto E. dan Hairiah . 2007. Biologi Tanah. Yogyakarta: Pustaka Adipura.

- Hermanto, Delima H. A., Muchjidin H. 2015. Laporan Analisis Kebijakan Tahun 2015 : Outlook Komoditas Pangan Strategis Tahun 2015-2019. [Online]. https://pse.litbang.pertanian.go.id/ind/pdf/files/anjak_2015_18.pdf. Diakses tanggal 28 November 2018.
- Hermawan, A., 2007, Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Disk, Artikel Ilmiah, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya.
- Holt, J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., William S. T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition Maryland, USA: Williams and Wilkins.
- Husein, E. 2011. Ameliorasi Cekaman Salinitas pada Padi Sawah dengan Bakteri Penghasil ACC Deaminase. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian.
- Jha, G., Rajeswhari R. and Shonti R. V. 2007. Functional Interplay Between Two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Secretion Systems in Modulating Virulence on Rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:31-40.
- Kawaguchi, A., Inoue K., and Ichinose Y. 2008. Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, and Tomato by Nonpathogenic *Agrobacterium vitis* Strain VAR03-1. *Journal of Biological Control.* 98 (11): 1218-1225.
- Kearns, L. 1993. Biological Control of *Erwinia amylovora* by *Erwinia herbicola*. Thesis. Catenburg University.
- Khaeruni, A., Muhammad T., Wijayanto T. dan Johan E. A. 2014. Perkembangan Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tiga Varietas Padi Sawah yang Diinokulasi pada Beberapa Fase Pertumbuhan. *J. Fitopatologi Indonesia* Vol. 10 (4): 123-130.
- Klement Z., Rudolph K., and Sand D. C. 1990. *Methods in Phytobacteriology.* Budapest: Academia Kiado. pg. 568.
- Lay, W. B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium.* Jakarta : Raja Grafindo Persada.
- Lelliot, Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of plants.* Oxford: Blackwell Sci. Public.
- Madigan, M. T., Martinko J. M. dan Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms.* Ninth Edition. Prentice-Hall. London.
- Marom. N., Rizal dan Muhammad B. 2017. Uji Efektivitas Waktu Pemberian Dan Konsentrasi PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) Terhadap Produksi dan Mutu Benih Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.). *J. Agriprima* Vol. 1 (2): 191-202
- Moustaine, M. Kahkahi R. E., Benbouazza A., Benkirane R., Achbani E. H. 2016. The Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Stimulating the Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Meknes Region, Morocco. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 17 (78): 363-373.

- Nawangsih, A. A., Tita W. dan Yana A. 2014. Kelimpahan Bakteri Rizosfer pada Sistem PHT-Biointensif serta Kemampuan Antagonismenya Terhadap *Sclerotium rolfsii* pada Kedelai. Jurnal HPT Tropika 14 (2): 110-120.
- Nurrochman, F. 2015. Eksplorasi Bakteri Selulolitik dari Tanah Hutan Mangrove Barus Kretek, Bantul, Yogyakarta. Skripsi. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Ou, S. H. 1985. Rice Disease. 2nd. England. Kiew Surrey.
- Park, M., Chungwoo K., Jinchul Y., Hyoungseok L., Wansik S., Seunghwan K. and Tongmin Sa. 2005. Isolation and Characterization of Diazotrophic Growth Promoting Bacteria from Rhizosphere of Agricultural Crops of Korea. Microbiological Research Journal 160 : 127-133.
- Pelezar, J. M. dan Chan E. C. S. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi II. Penerjemah Ratna Sri H. Jakarta : UI Press.
- Pratiwi, R. 2005. Perbedaan Daya Hambat terhadap Streptococcus Mutans dari Beberapa Pasta Gigi yang Mengandung Hebal. Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.) Vol. 38 (2) : 64-67.
- Rao S. 1994. Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman. Edisi 2. UI Press. Jakarta.
- Rao, S. 1982. Soil Microorganism and Plant Growth. Science Publisher Inc. USA.
- Raka, D., Alit W. dan I Made Budiasa. 2016. Pelestarian Tanaman Bambu Sebagai Upaya Rehabilitasi Lahan dan Konservasi Tanah di Daerah Sekitar Mata Air Pada Lahan Marginal di Bali Timur. J. Pertanian Berbasis Keseimbangan Ekosistem : 1-9.
- Schaad, N.W., Jones J. B., Chun W. 2001. Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogenic bacteria. Third Edition. Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Silvya, D., Fuhrmann J., Hartel. P., Zuberer D. 2005. Principles and Applications of Soil Microbiology. Pearson Education Inc. New Jersey
- Sitaramaju, S., Prasa N. V. V. S. D., Chenga R. V. Narayana. 2014. Impact of Pesticides Used for Crop Production on the Environment. JCHPS Special 3: 75-79.
- Sudir, B. N. dan Triny S. K. 2012. Epidemiologi, Patotipe, dan Strategi Pengendalian Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi. IPTEK Tanaman Pangan Vol. 7 (2): 79-87.
- Suparyono dan Sudir. 1992. Perkembangan Penyakit Bakteri Hawar Daun Pada Stadia Tumbuh yang Berbeda dan Pengaruhnya Terhadap Hasil Padi. Media Penelitian Sukamandi 12: 6-9.
- Suparyono, Sudir dan Suprihanto. 2003. Komposisi Patotipe Patogen Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi Stadium Tumbuh Berbeda. J. penelitian Pertanian 22 (1): 45-50.
- Susanti W.I., Widyastuti R., dan Wiyono S. 2015. Peranan Tanah Rizosfer Bambu Sebagai Bahan Untuk Menekan Perkembangan Patogen

Phytophthora palmivora dan Meningkatkan Pertumbuhan Bibit Pepaya. J Tanah Iklim 39 (2) : 63-72.

- Swings, J., M. V. D. Mooter, Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T. M., Kersters K. 1990. Reclassification of the Causal Agents of Bacterial Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. J. of Systematic Bacteriology Vol. 40 (3): 309-311.
- Thakuria, D, Talukdar N.C., Goswami C., Hazarika S., Boro R.C., Khan M.R. 2004. Characterization and Screening of Bacteria from Rhizosphere of Rice Grown in Acidic Soils of Assam. Curr Sci. 86:978-985.
- Tombe, M. 2002. Potensi Agensia Hayati Dalam Pengendalian Penyakit Tanaman Berwawasan Lingkungan dan Peranannya dalam Meningkatkan Sektor Agribisnis. Prosiding Seminar Nasional PFI Komda Purwokerto. Hal : 13-34.
- Trianto dan G. Sumantri. 2003. Pengembangan *Trichoderma harzianum* untuk pengendalian OPT Pangan dan Hortikultura. Makalah. Lab. PHPT Wilayah Semarang.
- Van Loon, L. C. 2007. Plant Response to Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Eur. J. Plant Pathology Vol. 1 (119): 243-254.
- Volksch, B. and May, R. 2001. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycine* by Epiphytic Bacteria Under Field Conditions. J. Microbiological Ecology (41): 132-139.
- Wahyudi, A. T., Meliah S. dan Nawangsih. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Bakteri Penyebab Hawar Daun Pada Padi : Isolasi, Karakterisasi, dan telaah Mutagenensis dengan Transposon. Makara, Sains Vol. 15 (1):89-96.
- Widjaja, E.A., Sastrapradja S., Prawiroatmodjo S., dan Soenarko S.. 1995. Jenis-Jenis Bambu. Jakarta: Balai Pustaka.
- Wright S.A.I., Beer S.V. 2006. *Pantoea agglomerans*, a biocontrol agent and ubiquitous microorganism – friend or foe? Proc. 1st Int. Symp. on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, in: Zeller W., Ulrich C. (Eds.), Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 408, pp. 334–338.
- Wuryandari, Y., Purnawati, A., Arwiyanto, T. Hadisutrisno, B. 2008. Dose and Dillution of The Effectiveness of Fluorescents in Tomato Against *Ralstonia solanacearum* in Vitro. J. Maperta Vol 10 (2): 72-78.
- Yazid, M. 2014. Peranan Isolat Bakteri Indigenous Sebagai Agen Bioremediasi Perairan Yang Terkontaminasi Uranium. Jurnal IPTEK nuklir Ganendra Vol 17 (1): 35-44.
- Zhang. H and S. Wang. 2013. Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique Pathosystem. Plant Biology. 16:188-195.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil analisa uji ragam ANOVA

Tabel 6. Hasil analisa uji ragam pada 1 HSI

SK	JK	db	KT	F hitung	P	F tabel 5%
Perlakuan	23.43951	6	3.906585	6.802068	0.000409	2.572712
Galat	12.06078	21	0.574323			
Total	35.50029	27				

Tabel 7. Hasil analisa uji ragam pada 2 HSI

SK	JK	db	KT	F hitung	P	F tabel 5%
Perlakuan	23.31791	6	3.886319	6.729169	0.000438	2.572712
Galat	12.1282	21	0.577533			
Total	35.44611	27				

Tabel 8. Hasil analisa uji ragam 3 HSI

SK	JK	db	KT	F hitung	P	F tabel 5%
Perlakuan	19.83986	6	3.306643	5.633288	0.001287	2.572712
Galat	12.32664	21	0.586983			
Total	32.16649	27				

Lampiran 2. Komposisi media Burk

Berikut Komposisi Media Burk menurut Park *et al.*, (2004)

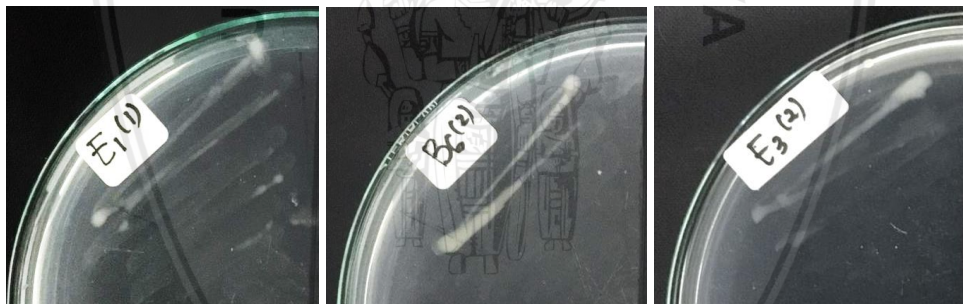
1. Glukosa (10 gr)
2. Agar (15 gr)
3. Aquades (1 L)
4. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 gr)
5. K_2HPO_4 (0,52 gr)
6. KH_2PO_4 (0,41 gr)
7. Na_2SO_4 (0,05 gr)
8. $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,0025 gr)
9. $CaCl_2$ (0,2 gr)
10. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,005 gr).

Lampiran 3. Komposisi media Pikovskaya

Berikut komposisi media Pikovskaya menurut Schaad *et al.*, (2001)

1. Glukosa (10 gr)
2. Ca_3HPO_4 (6,2 gr)
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,32 gr)
4. KCl (0,3 gr)
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,96 gr)
6. Ekstrak khamir (1,45 gr)
7. MnSO_4 (25 mg)
8. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 gr)
9. NaCl (0,2 gr)
10. Agar (20 gr)
11. Aquades (1 L).

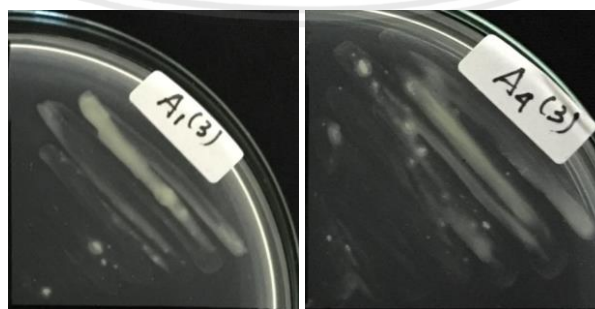
Lampiran 4. Dokumentasi pengamatan pertumbuhan bakteri penambatan nitrogen pada media Burk



Bakteri E1.1

Bakteri B6.2

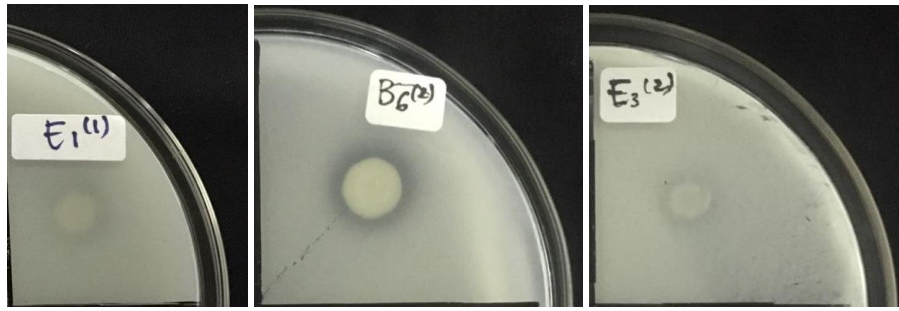
Bakteri E3.2



Bakteri A1.3

Bakteri A4.3

Lampiran 5. Dokumentasi bakteri pelarut fosfat pada media Pikovskaya



Bakteri E1.1

Bakteri B6.2

Bakteri E3.2



Bakteri A1.3

Bakteri A4.3

Lampiran 6. Hasil uji Hipersensitif



Bakteri B6.2

Bakteri E1.1

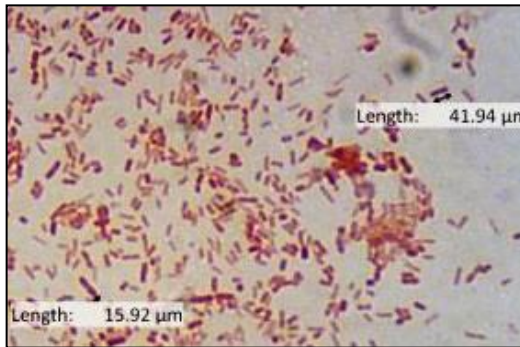
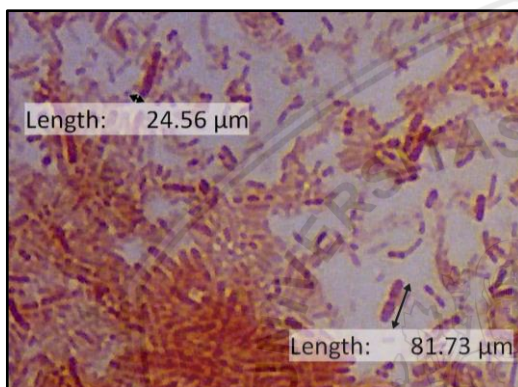
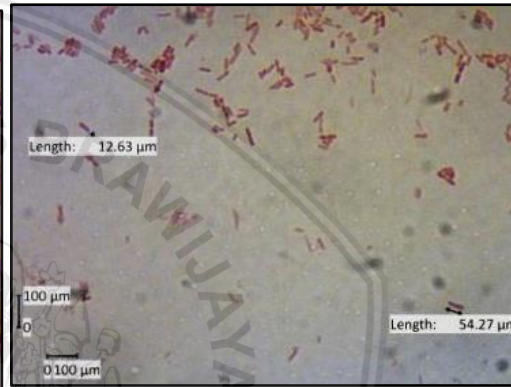
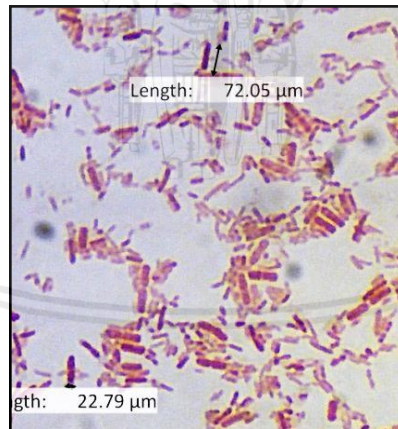
Bakteri A4.3



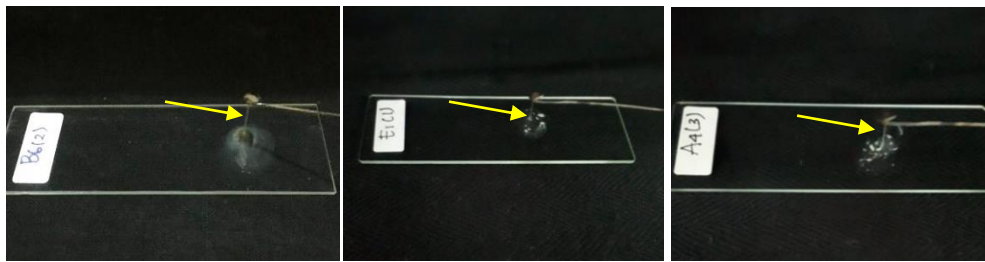
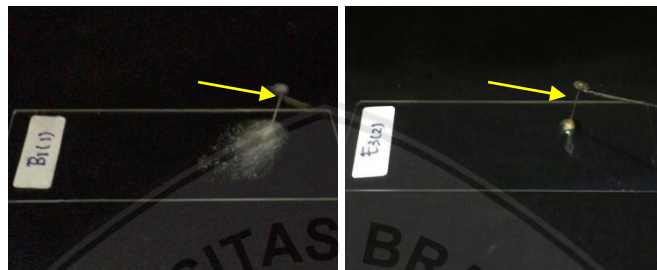
Bakteri A1.3

Bakteri E3.2

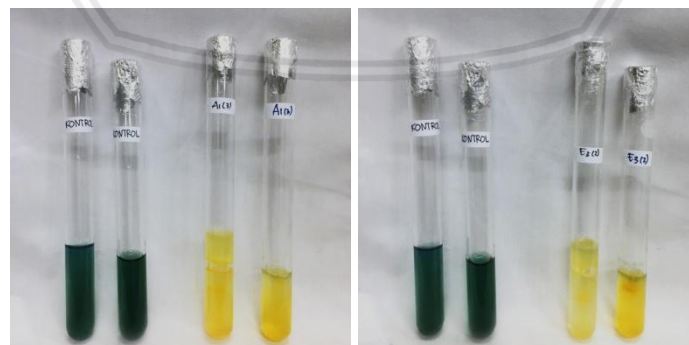
Lampiran 7. Hasil pewarnaan Gram

**Bakteri B6.2****Bakteri E1.1****Bakteri A4.3****Bakteri E3.2****Bakteri A1.3**

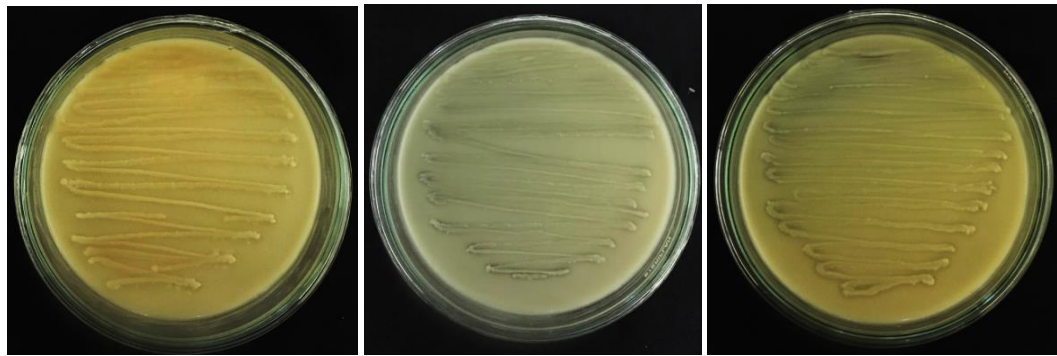
Lampiran 8. Hasil pegujian KOH 3%

**Bakteri B6.2****Bakteri E1.1****Bakteri A4.3****Bakteri A1.3****Bakteri E3.2**

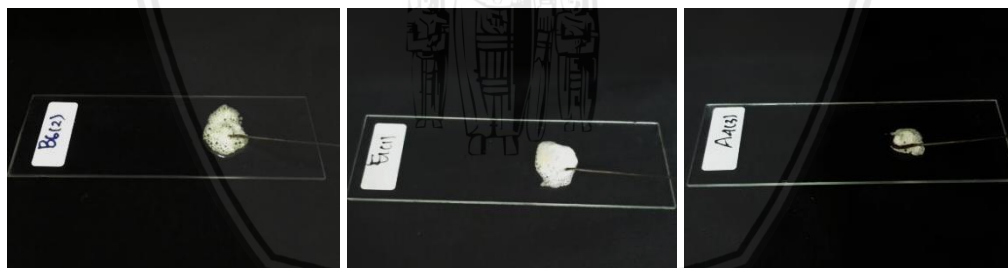
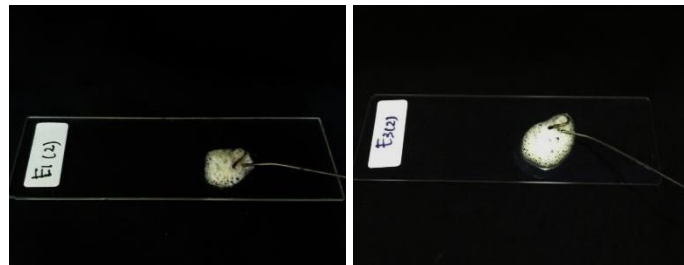
Lampiran 9. Hasil uji oksidatif fermentatif

**Bakteri B6.2****Bakteri E1.1****Bakteri A4.3****Bakteri A1.3****Bakteri E3.2**

Lampiran 10. Hasil pertumbuhan bakteri pada media YDC

**Bakteri B6.2****Bakteri E1.1****Bakteri A4.3****Bakteri A1.3****Bakteri E3.2**

Lampiran 11. Hasil uji katalase

**Bakteri B6.2****Bakteri E1.1****Bakteri A4.3****Bakteri A1.3****Bakteri E3.2**