

**POTENSI BAKTERI ANTAGONIS PADA LIMBAH CAIR
TAHU UNTUK MENGHAMBAT BAKTERI
Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* PENYEBAB
PENYAKIT PUSTUL BAKTERI PADA KEDELAI
(*Glycine max* L.)**

Oleh
NOVITA SARI



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG
2019**

**POTENSI BAKTERI ANTAGONIS PADA LIMBAH CAIR
TAHU UNTUK MENGHAMBAT BAKTERI
Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* PENYEBAB
PENYAKIT PUSTUL BAKTERI PADA KEDELAI
(*Glycine max* L.)**

**OLEH :
NOVITA SARI
155040200111092**

**PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI
MINAT PERLINDUNGAN TANAMAN**

SKRIPSI

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

FAKULTAS PERTANIAN

**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 atau pendapat yang pernah ditulis oleh orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, 30 Juli 2019

Novita Sari



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Penelitian : Potensi Bakteri Antagois pada Limbah Cair Tahu untuk Menghambat Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Penyebab Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai (*Glycine max* L.)

Nama Mahasiswa : Novita Sari

NIM : 155040200111092

Jurusan : Hama dan Penyakit Tumbuhan

Program Studi : Agroekoteknologi

Disetujui
Pembimbing Utama, Pembimbing Pendamping II,

Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D
NIP. 19720919 199802 1 001

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

Diketahui,
Ketua Jurusan

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

Tanggal Persetujuan :

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I

Penguji II

Dr. Ir. Syamsuddin Djauhari, MS
NIP. 19550522 198103 1 006

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

Penguji III

Penguji IV

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

Dr. Akhmad Rizali, SP., M.Si
NIK. 201405 770415 1 001

Tanggal Lulus :



Skripsi ini kupersembahkan untuk Alm. Bapak dan Mama tercinta.
Terima kasih atas doa dan dukungan yang telah diberikan selama ini.



RINGKASAN

Novita Sari. 155040200111092. Potensi Bakteri Antagonis Pada Limbah Cair Tahu Untuk Menghambat Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Penyebab Penyakit Pustul Bakteri Pada Kedelai (*Glycine max* L.). Di bawah bimbingan Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D sebagai Pembimbing Utama dan Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc sebagai Pembimbing Pendamping.

Kedelai (*Glycine max* L.) merupakan salah satu tanaman palawija di Indonesia. Kedelai merupakan salah satu bahan baku utama pembuatan tahu. Proses produksi tahu di Indonesia masih menggunakan cara tradisional sehingga menghasilkan limbah cair. Beberapa penelitian membuktikan bahwa pada limbah cair tahu mengandung bahan organik tinggi dan diduga terdapat mikroorganisme yaitu bakteri yang dapat mengendalikan patogen tanaman. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengkaji bakteri antagonis pada limbah cair tahu dalam mengendalikan patogen *X. a.* pv. *glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada kedelai secara *in vitro*.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Desember 2018 hingga bulan Mei 2019. Tahapan penelitian meliputi isolasi dan identifikasi bakteri penyebab penyakit pustul bakteri, eksplorasi dan seleksi bakteri limbah cair tahu, uji hipersensitif bakteri antagonis limbah cair tahu, uji penghambatan bakteri antagonis terhadap *X. a.* pv. *glycines* secara *in vitro*. Uji penghambatan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 8 perlakuan dan diulang sebanyak 4 kali, serta karakterisasi dan identifikasi bakteri sampai tingkat genus.

Hasil eksplorasi diperoleh 60 isolat bakteri limbah cair tahu dengan 33 isolat bakteri yang memiliki kemampuan antagonis pada *X.a.* pv. *glycines*. Dari 33 isolat bakteri dipilih 6 bakteri terbaik yaitu isolat bakteri dengan kode A1, A2, A15, C8, D7, dan D9 untuk uji selanjutnya. Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa 6 isolat bakteri limbah cair tahu terpilih mampu menghambat pertumbuhan bakteri *X.a.* pv. *glycines*. Hasil analisis ragam menunjukkan antar perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap hasil rerata diameter zona hambat terhadap bakteri *X.a.* pv. *glycines*. Rerata diameter zona hambat yang tertinggi yaitu pada isolat C8, D7, dan D9 sedangkan hasil terendah yaitu pada isolat A1, A2, dan A15. Hasil rerata diameter zona hambat keenam isolat bakteri berbeda nyata terhadap kontrol Streptomisin. Hasil rerata diameter zona hambat isolat A1, A2, dan A15 tidak berbeda nyata terhadap kontrol akuades steril. Berdasarkan hasil karakterisasi dan identifikasi terhadap bakteri antagonis diketahui bahwa isolat A1, D7, dan D9 termasuk ke dalam genus *Pantoea*. Isolat bakteri A2 dan A15 termasuk ke dalam genus *Clostridium*. Isolat bakteri C8 termasuk ke dalam genus *Erwinia*.

SUMMARY

Novita Sari. 155040200111092. Potential of Antagonistic Bacteria in Tofu Liquid Waste to Inhibit *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Bacteria Caused Pustule Disease in Soybean (*Glycine max* L.). Supervised by Luqman Qurata Aini, SP., M.Sc., Ph.D and Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc.

Soybean (*Glycine max* L.) is one of the secondary crops in Indonesia. Soybean is one of the raw materials for making tofu. Most of tofu production in Indonesia is using traditional methods to produce liquid waste. Some studies have found that in tofu liquid waste can produce bacteria that can control plant pathogens. Therefore, it is to do a study related to the potential of antagonistic bacteria in tofu liquid waste. The purpose of this study antagonistic bacteria in tofu liquid waste to inhibit pathogen *X. a.* pv. *glycines* bacterial caused pustule disease *in vitro*.

The research was conducted at the Laboratory of Plant Diseases, Department of Pests and Plant Diseases, Faculty of Agriculture, Brawijaya University Malang, starting in December 2018 until May 2019. The stages of the study included isolation and identification of bacteria causing bacterial pustules, exploration and selection of tofu liquid waste bacteria, hypersensitivity of antagonistic bacteria in tofu liquid waste, test the inhibition of antagonistic bacteria against *X. axonopodis* pv. *glycines in vitro* using a Randomized Complete Design (RAL) 7 treatments and repeated 4 times, as well as characterization and identification antagonistic bacteria to the genus level.

The exploration results obtained 60 isolates of tofu liquid waste bacteria with 33 bacterial isolates that had antagonistic abilities at *X.a.* pv. *glycines*. From the 33 bacterial isolates, 6 of the best bacteria were selected, namely bacterial isolates with codes A1, A2, A15, C8, D7, and D9 for further testing. The antagonistic test results showed that 6 isolates bacteria were able to inhibit the growth of bacteria *X.a.* pv. *glycines*. The results of the variance analysis showed that between treatments gave a real effect on the results of the average clear zone diameter of bacteria *X.a.* pv. *glycines*. From the six selected bacterial isolates, the highest clear zone diameter results were obtained, were in isolates C8, D7, and D9 while the lowest results were in isolates A1, A2, and A15. The results of the average diameter of clear zone of the six bacterial isolates were significantly different from the control of Streptomycin. The results of the average diameter of clear zone isolates A1, A2, and A15 were not significantly different from the control of sterilized aquades. Based on the results of characterization and identification of antagonistic bacteria it is known that isolates A1, D7, and D9 belong to the genus *Pantoea*. The bacterial isolates A2 and A15 belong to the genus *Clostridium*. C8 bacterial isolates belong to the genus *Erwinia*.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Potensi Bakteri Antagonis Pada Limbah Cair Tahu untuk Menghambat Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Penyebab Penyakit Pustul Bakteri Pada Kedelai (*Glycine max* L.)”.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Mochammad Bakri (alm) dan Ibu Ponijah selaku kedua orang tua atas doa, bimbingan, kasih sayang serta dukungan yang tiada henti. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc selaku dosen pembimbing pendamping atas pengarahan, saran, dan bimbingannya kepada penulis. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS. selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan atas segala nasihat dan bimbingannya serta kepada seluruh staf, teman-teman jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan (Lab. Bakteri), teman-teman kost (Aliyya, Amel, Yeni) atas bantuannya dan dukungannya dalam pelaksanaan penyusunan skripsi ini.

Penulis berharap semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak serta memberikan sumbangan pemikiran dalam kemajuan ilmu pengetahuan.

Malang, 16 Juli 2019

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Sidoarjo pada tanggal 16 November 1997 sebagai anak tunggal dari Bapak Mochammad Bakri (alm) dan Ibu Ponijah. Penulis menempuh pendidikan dasar pada tahun 2003-2009 di SDN Siwalankerto II Surabaya. Pada tahun 2009 penulis meneruskan pendidikan di SMP Negeri 8 Makassar dan SMP Negeri 21 Surabaya lulus pada tahun 2012. Pada tahun 2012 penulis meneruskan pendidikan di SMA Al-Falah Surabaya dan lulus pada tahun 2015. Pada tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikan Strata 1 (S1) di Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang, melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN)

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan kemahasiswaan dan kepanitiaan. Penulis mengikuti kepanitiaan Inaugurasi FP UB 2015, Pasca Rantai VI, Rantai VII, serta kepanitiaan yang lain. Penulis juga aktif dalam organisasi dan menjabat sebagai Koordinator Bursa UKM Taekwondo Universitas Brawijaya. Tahun 2017. Penulis juga menjadi asisten praktikum Hama dan Penyakit Penting Tanaman pada tahun 2017-2018 dan asisten praktikum Manajemen Agroekosistem pada tahun 2018.

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
SUMMARY	ii
KATA PENGANTAR	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Manfaat	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Penyakit Pustul Bakteri pada Tanaman Kedelai	5
2.2 Pengendalian Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai	7
2.3 Limbah Cair Tahu	8
2.4 Potensi Bakteri Sebagai Agens Pengendali Hayati.....	9
2.5 Mekanisme Penghambatan Bakteri.....	10
III. BAHAN DAN METODE	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	12
3.2 Alat dan Bahan.....	12
3.3 Metode Penelitian.....	12
3.4 Pelaksanaan Metode Penelitian.....	12
3.5 Variabel Pengamatan	20
3.6 Analisis Data	20
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Karakter dan Patogenesitas Bakteri Penyebab Penyakit Pustul Bakteri	21
4.2 Hasil Eksplorasi Bakteri Limbah Cair Tahu	24
4.3 Hasil Uji Hipersensitif Bakteri Antagonis Limbah Cair Tahu.....	26
4.4 Penghambatan akteri Antagonis terhadap <i>X.a. pv. glycines</i> secara <i>in vitro</i>	26
4.5 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Antagonis	29
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	45

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1	Perlakuan uji penghambatan bakteri <i>X.a. pv. glycines</i> secara <i>in vitro</i> ...	15
2	Karakteristik morfologi, fisiologi dan biokimia bakteri bergejala pustul bakteri	23
3	Rerata diameter zona hambat hasil seleksi bakteri limbah cair tahu yang bersifat antagonis terhadap bakteri <i>X.a. pv. glycines</i>	25
4	Uji penghambatan bakteri antagonis terhadap pertumbuhan bakteri <i>X.a. pv. glycines</i>	27
5	Karakteristik morfologi, fisiologi, dan biokimia bakteri antagonis	30



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1	Koloni bakteri <i>X. a. pv. glycines</i> pada media kultur	5
2	Kenampakan mikroskopis bakteri <i>Xanthomonas</i>	6
3	Gejala pustul bakteri pada kedelai	7
4	Diagram pengujian bakteri hingga tingkat genus	19
5	Pertumbuhan bakteri hasil isolasi pada media NA.....	21
6	Gejala penyakit pustul bakteri dari hasil uji patogenesisitas	22
7	Gejala nekrotik pada daun tembakau	22
8	Pertumbuhan bakteri limbah cair tahu 10^{-9}	24
9	Hasil uji hipersensitif.....	26
10	Penghambatan bakteri antagonis terhadap <i>X. a. pv. glycines</i> secara <i>in vitro</i>	28
11	Koloni tunggal bakteri antagonis.....	30
12	Hasil uji KOH 3% pada bakteri antagonis.....	31
13	Hasil Pewarnaan Gram bakteri antagonis.....	32
14	Bakteri antagonis yang memiliki spora	33
15	Uji katalase dengan reaksi positif	33
16	Hasil uji oksidatif-fermentatif (OF).....	34
17	Pertumbuhan bakteri pada media YDC	35



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1	Dokumentasi hasil identifikasi bakteri patogen	45
2	Tabel analisis ragam rerata diameter uji antagonism bakteri limbah cair tahu	46
3	Dokumentasi hasil uji KOH 3% bakteri antagonis	47
4	Dokumentasi hasil uji pewarnaan Gram bakteri antagonis	47
5	Dokumentasi hasil uji pewarnaan spora bakteri antagonis	48
6	Dokumentasi hasil uji katalase bakteri antagonis.....	48
7	Dokumentasi hasil uji oksidatif fermentatif bakteri antagonis.....	49
8	Dokumentasi hasil uji pada media YDC	50
9	Dokumentasi hasil uji hipersensif bakteri antagonis	51
10	Dokumentasi hasil morfologi koloni bakteri antagonis	52



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kedelai (*Glycine max* L.) merupakan salah satu tanaman palawija yang dibutuhkan hampir sebagian besar masyarakat di Indonesia. Kedelai termasuk dalam golongan famili Leguminoceae. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2017), pada tahun 2015-2017 produksi kedelai mengalami penurunan. Pada tahun 2015 total produksi kedelai di Indonesia mencapai 963 ton, tahun 2016 mencapai 859 ton, dan pada tahun 2017 mencapai 675 ton. Pemenuhan kebutuhan kedelai sebanyak 67,28% atau 1,96 juta ton masih diimpor dari luar. Konsumsi kedelai di Indonesia termasuk cukup tinggi, mengingat kedelai merupakan salah satu bahan baku pembuatan tempe dan tahu. Berdasarkan data Susenas dalam Kementerian pertanian (2014), konsumsi tempe dan tahu di Indonesia pada tahun 2014 per orang per tahun mencapai 6,95 kg dan 7,068 kg.

Tahu merupakan salah satu makanan tradisional yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat di Indonesia. Industri tahu sering dijumpai hampir pada tiap daerah di Indonesia. Proses produksi tahu di Indonesia mayoritas masih menggunakan cara atau proses secara tradisional. Pada produksi tahu secara tradisional tersebut akan menghasilkan limbah cair. Limbah cair tahu merupakan buangan atau sisa pengolahan kedelai menjadi tahu yang terbuang karena tidak terbentuk dengan baik (Nohong, 2011). Limbah cair industri tahu juga dapat menimbulkan masalah salah satunya yaitu masalah pencemaran sehingga diperlukan untuk melakukan pemanfaatan pada limbah cair tahu tersebut. Menurut Lestari (2011), terdapat bahan-bahan organik tinggi yang terkandung di dalam air buangan industri tahu. Di dalam kandungan bahan-bahan organik tersebut diduga terdapat mikroorganisme salah satunya yaitu bakteri. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, bakteri yang ditemukan pada limbah cair tahu yaitu bakteri dari genus *Pantoea* dan genus *Bacillus* memiliki kemampuan untuk menekan perkembangan patogen *Sclerotium rolfsii* pada tanaman kedelai secara *in vitro* (Simbolon, 2018).

Bakteri merupakan mikroba uniseluler yang berukuran kecil yaitu 0,5-1 μ m x 2,0-5,0 μ m. Beberapa kelompok bakteri memiliki flagella dan berbentuk bulat, batang, dan lengkung atau vimbri (Hidayat *et al.*, 2006). Peran bakteri pada

tanaman tidak hanya sebagai patogen tanaman yang merugikan, namun bakteri juga memiliki peran yang menguntungkan salah satunya yaitu sebagai agens antagonis. Jenis bakteri antagonis yang telah banyak diteliti sebagai agens antagonis yaitu *Bacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas fluorescens* dan Actinomycetes (Sadler, 2005). Bakteri antagonis mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder atau antibiotik sebagai antibakteri maupun antifungi sehingga mampu menghambat pertumbuhan patogen penyebab penyakit pada tanaman (Diniyah, 2010).

Penyakit tanaman merupakan suatu keadaan abnormal yang ditandai dengan perubahan pada fisiologis tanaman. Salah satu penyakit yang menyerang tanaman kedelai yaitu penyakit pustul bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*X. a.* pv. *glycines*). Gejala pada penyakit ini akan semakin parah seiring dengan bertambahnya umur tanaman kedelai. Kehilangan hasil pada tanaman kedelai yang disebabkan oleh penyakit pustul bakteri sebesar 20-30% pada tanaman rentan dan pada tingkat serangan parah dengan kondisi lingkungan yang mendukung untuk persebaran penyakit, kehilangan hasil akan mencapai 21-40% (Panorama, 2005).

Upaya pengendalian yang dilakukan untuk mengendalikan penyakit pustul bakteri yaitu dengan penggunaan varietas tahan (Kasno *et al*, 1992). Namun kultivar kedelai di Indonesia sebagian besar masih rentan terhadap penyakit pustul bakteri sehingga diperlukan alternatif upaya pengendalian. Sejalan dengan upaya pemerintah untuk meningkatkan mutu lingkungan, maka usaha pengendalian hama dan penyakit sekarang lebih diarahkan kepada pemanfaatan musuh-musuh alami hama dan agens antagonis yang lebih dikenal dengan pengendalian secara hayati. Pengendalian secara hayati ini dilakukan dengan menggunakan satu atau lebih organisme secara alami atau melalui manipulasi lingkungan, inang atau antagonis yaitu melalui penambahan satu atau lebih agens antagonis seperti bakteri (Cook and Baker, 1983). Pengendalian penyakit pustul bakteri pada kedelai dengan menggunakan agens hayati juga sudah mulai dilakukan. Menurut penelitian Megasari (2015), pengendalian dengan menggunakan bakteri antagonis yaitu *Corynebacterium* sp. dan *Bacillus* sp. untuk mengendalikan penyakit pustul

bakteri pada kedelai didapatkan hasil yaitu kedua bakteri mampu mengendalikan penyakit pustul bakteri tersebut.

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan penelitian terkait dengan eksplorasi dan pemanfaatan bakteri antagonis pada limbah cair tahu sebagai alternatif pengendalian terhadap penyakit pustul bakteri yang disebabkan patogen *X. a. pv. glycines* pada tanaman kedelai.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan pada penelitian ini yaitu :

1. Apakah terdapat bakteri pada limbah cair tahu yang memiliki potensi antagonis terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai?
2. Bagaimana kemampuan antagonis bakteri pada limbah cair tahu terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai secara *in vitro*?
3. Bagaimana karakteristik bakteri pada limbah cair tahu yang memiliki potensi antagonis terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Mengkaji keberadaan bakteri pada limbah cair tahu yang memiliki potensi antagonis terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai.
2. Mengkaji kemampuan antagonis bakteri pada limbah cair tahu terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai secara *in vitro*.
3. Mengkaji karakteristik bakteri pada limbah cair tahu yang memiliki potensi antagonis terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini yaitu pada limbah cari tahu terdapat isolat bakteri yang memiliki potensi antagonis terhadap patogen *X. a. pv. glycines* penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai secara *in vitro*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai upaya serta landasan informasi dan pengembangan terhadap bakteri pada limbah cair tahu yang berpotensi untuk mengendalikan penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai.



II. TINJAUAN PUSTAKA

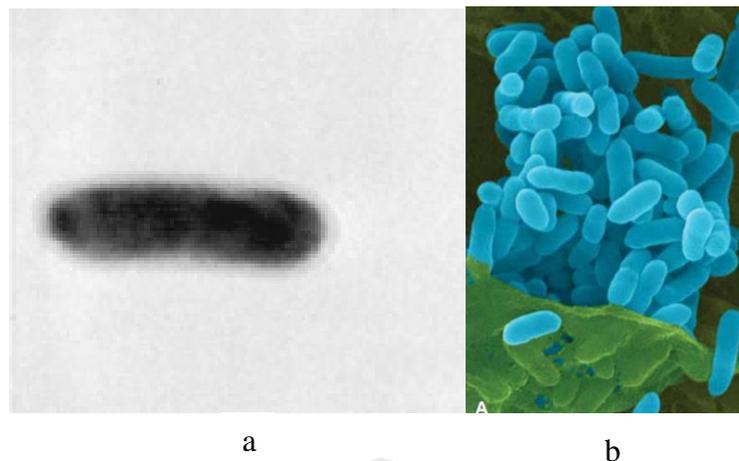
2.1 Penyakit Pustul Bakteri pada Tanaman Kedelai

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*X. a.* pv. *glycines*) merupakan bakteri penyebab penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai. Klasifikasi dari patogen *X. a.* pv. *glycines* sebagai berikut (Agrios, 2005), Divisi : Gracilicutes, Kelas : Proteobacteria, Ordo : Pseudomonadales, Family : Pseudomonadaceae, Genus : *Xanthomonas*. Bakteri ini sebelumnya dikenal dengan nama *X. campestris* pv. *glycines* namun berubah nama berdasarkan nomenklatur baru menjadi *X. a.* pv. *glycines* (Machmud *et al.*, 1999). Karakteristik dari bakteri ini pada kenampakan makroskopis yaitu koloni berwarna kuning cerah, berbentuk bulat, cembung, dan mukoid atau berlendir (Violatti and Nilvanira, 2016) (Gambar 1). Karakter mikroskopik pada bakteri ini yaitu sel bakteri berbentuk batang yang berukuran 0,4-1,0 x 1,2-3 μm (Agrios, 2005) (Gambar 2). Bakteri dengan genus *Xanthomonas* bergerak dengan menggunakan flagel polar. Hasil uji fisiologi, biokimia menunjukkan bahwa isolat *X. a.* pv. *glycines* bereaksi gram negatif, dapat menghidrolisa pati, bersifat oksidatif dan katalase yang positif (Khaeruni *et al.*, 2008). Semua spesies dari genus *Xanthomonas* merupakan patogen tanaman dan ditemukan hanya berasosiasi dengan tanaman dan bahan organik (Agrios, 2005).



Gambar 1. Koloni bakteri *X. a.* pv. *glycines* pada media kultur (Violatti and Nilvanira, 2016)

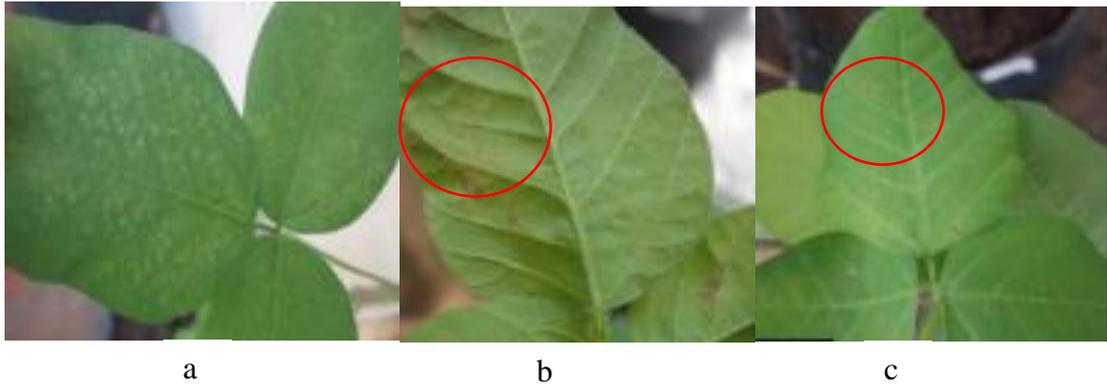


Gambar 2. Kenampakan mikroskopis bakteri *Xanthomonas* (a: mikrograf elektron bakteri *Xanthomonas* (Goodman and Huang; Agrios, 2005), b: bakteri *Xanthomonas* (McGovern; Agrios, 2005))

2.1.2 Gejala Serangan Penyakit Pustul Bakteri pada Tanaman Kedelai

Serangan penyakit pustul bakteri dapat terjadi sejak fase pembentukan daun hingga fase pembentukan polong. Gejala pada penyakit ini tampak pada tanaman kedelai setengah umur, kurang lebih 40 hari setelah tanam. Serangan penyakit akan lebih parah seiringin dengan bertambahnya umur tanaman. Gejala pustul bakteri berupa bercak-bercak kecil, terpisah satu sama lain, berwarna kuning hingga kecoklatan, bagian tengah berwarna kecoklatan (nekrosis) dengan tepi bercak dikelilingi area berwarna kuning, pustul dapat bergabung satu sama lain menghasilkan pustul yang lebih lebar, daun menguning, dan menyebabkan daun gugur lebih awal (Kusuma *et al.*, 2016) (Gambar 3). Bahkan pada tanaman yang rentan, infeksi yang berat dapat mengakibatkan defoliasi total (Dunleavy *et al.*, 1966). Selain menyerang pada daun, penyakit ini juga dapat menyerang benih. Bakteri yang terbawa benih, akan terbawa hingga benih ditanam dan tumbuh (Khaeruni *et al.*, 2007).

Gejala penyakit pustul bakteri sulit dibedakan dengan gejala penyakit karat daun yang disebabkan oleh jamur *Phakopsora pachryhizi*. Perbedaannya yaitu pada penyakit pustul bakteri tidak terdapat spora pada lubang seperti yang terjadi pada gejala penyakit karat daun. Selain itu, pada gejala penyakit pustul terdapat satu celah yang melewati pusat bercak dan bercak lebih kecil (Semangun, 1991).



Gambar 3. Gejala pustul bakteri pada daun kedelai (a: gejala awal, b: gejala pada permukaan bawah daun, c: gejala pada permukaan atas daun (Kusuma *et al*, 2016))

2.1.3 Faktor yang Mempengaruhi Perkembangan Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai

Kemampuan bakteri dalam menimbulkan penyakit pada tanaman inangnya bergantung pada kondisi lingkungan, fisiologi inang, fisiologi patogen serta gejala dari faktor patogenisitas yang memerlukan koordinasi dari fungsi pada bakteri (Sigeo 1993; Rusmana *et al*, 2005). Bakteri *X. a. pv. glycines* dapat bertahan pada biji, permukaan residu tanaman dan pada rizosfer. Gulma *Dolichos biflorus*, buncis jenis tertentu, dan kacang tunggak dapat bertindak sebagai tanaman inang bakteri penyebab penyakit pustul bakteri ini.

Di lapang, penyakit ini umumnya berkembang di dataran rendah pada saat musim hujan, dalam cuaca basah, dan suhu yang relatif tinggi dengan suhu optimum 30-35°C. Penyakit pustul bakteri juga sangat dipengaruhi oleh suhu dan kelembapan yang tinggi (Semangun, 1991). Penyebaran bakteri dibantu oleh percikan air hujan dan daun yang saling bersinggungan karena hembusan angin. Bakteri masuk ke tanaman melalui lubang-lubang alami seperti stomata dan hidatoda atau luka, dan memperbanyak diri di dalam sel. Bakteri pustul juga dapat ditularkan melalui benih kedelai.

2.2 Pengendalian Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai

Pengendalian terhadap penyakit pustul bakteri pada kedelai yang sampai saat ini diterapkan dikalangan petani yaitu penggunaan varietas tahan. Namun penggunaan varietas tahan juga memiliki kendala yaitu varietas kedelai yang terbaru rata-rata belum diketahui tanggapan praktisnya terhadap penyakit pustul bakteri (Rahayu, 2005) selain itu juga banyak galur yang masing-masing

menunjukkan genotip dan virulensi yang berbeda sehingga pengendalian dengan varietas tahan dengan daya tahan vertikal sulit dilakukan (Rukayadi *et al.*, 1999; Kusuma *et al.*, 2016).

Pengendalian yang praktis dan cepat seperti pengendalian kimiawi menggunakan bakterisida juga tidak dianjurkan bagi petani karena biaya yang mahal (Saleh dan Hardaningsih, 2013), selain itu juga menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan seperti residu yang tertinggal di dalam tanah. Sehingga pengendalian secara hayati dengan memanfaatkan agens antagonis dilakukan sebagai upaya pengendalian yang ramah lingkungan. Menurut Yanti *et al.*, (2017) bakteri *Bacillus thuringiensis* menunjukkan kemampuan yang relatif stabil dalam menekan perkembangan penyakit pustul bakteri pada kedelai. Menurut Suskandini (2007) bakteri *Pseudomonas fluorescens* dari tanah pertanaman kedelai memiliki kemampuan penghambatan yang terbesar (ditunjukkan dengan diameter zona hambat terbesar) terhadap patogen penyebab pustul kedelai. Menurut penelitian Kusuma *et al.*, (2016), bahwa aplikasi teh kompos juga mampu mengendalikan penyakit pustul bakteri pada kedelai. Hasil pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa dalam cawan menunjukkan adanya zona hambat. Sedangkan aplikasi pada tanaman menunjukkan bahwa aplikasi teh kompos mampu menekan serangan penyakit pustul bakteri sebesar 16,44%.

2.3 Limbah Cair Tahu

Limbah tahu merupakan buangan atau sisa pengolahan kedelai menjadi tahu yang terbuang karena tidak terbentuk dengan baik. Limbah tahu terdiri dari dua jenis yaitu limbah padat dan limbah cair tahu. Limbah cair merupakan bagian yang berpotensi mencemari lingkungan. Limbah cair tahu berasal dari sisa air tahu yang tidak menggumpal sempurna, proses perendaman, pencucian kedelai, pencucian alat proses produksi tahu, penyaringan dan pengepresan atau pencetakan tahu (Nohong, 2010). Jumlah limbah cair tahu yang dihasilkan oleh industri pembuatan tahu kira kira mencapai 15-20 l/kg bahan baku kedelai yang digunakan pada proses pembuatan tahu. Pada umumnya limbah padat tahu dapat dimanfaatkan untuk pakan ternak, sedangkan limbah tahu yang berbentuk cair akan dibuang ke perairan sehingga dapat memberikan dampak buruk bagi kualitas air. Dampak buruk yang terjadi seperti mengakibatkan bau busuk pada sungai atau tempat

disekitar pembuangan limbah cair tahu tersebut (Yudhistira *et al.*, 2016). Secara umum, karakteristik limbah cair tahu dapat digolongkan ke dalam karakter fisika dan kimia. Karakter fisika meliputi kekeruhan, suhu, zat padat, dan bau. Karakter kimia dibedakan atas kimia organik dan anorganik. Kimia organik meliputi kandungan organik (*biological oxygen demand*, *chemycal oxygen demand*, *total organic carbon*), oksigen terlarut (*dissolved oxygen*), minyak atau lemak, dan nitrogen total. Sedangkan kimia anorganik meliputi pH, Pb, Ca, Fe, Cu, Na, dan sulfur. (Kaswinarni, 2007).

Cairan pada limbah cair tahu, mengandung kadar protein yang tinggi yang dapat segera terurai. Limbah cair tahu mengandung bahan organik yang tinggi yaitu protein dan asam amino. Senyawa protein memiliki jumlah yang besar yaitu sekitar 40-60%, karbohidrat 25%-50%, dan lemak 10% (Sugiharto, 1994). Komponen terbesar dari limbah cair tahu yaitu protein (N-total) sebesar 226,06-434,78 mg/l, sehingga masuknya limbah cair tahu ke lingkungan perairan akan meningkatkan total nitrogen di perairan tersebut (Herlambang, 2002). Komponen nutrisi lengkap dari limbah cair tahu yang masih mengandung protein dengan kadar tinggi memungkinkan mikroorganisme yang dapat tumbuh di dalamnya (Sulistyaningtyas, 2006). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, bakteri yang ditemukan pada limbah cair tahu yaitu bakteri dari genus *Pantoea* dan genus *Bacillus* memiliki kemampuan untuk menekan perkembangan patogen *Sclerotium rolfsii* pada tanaman kedelai secara *in vitro* (Simbolon, 2018).

2.4 Potensi Bakteri sebagai Agens Pengendali Hayati

Sejalan dengan upaya pemerintah untuk meningkatkan mutu lingkungan, maka usaha pengendalian hama dan penyakit yang sekarang dilakukan lebih mengarah kepada pemanfaatan musuh-musuh alami. Pemanfaatan musuh-musuh alami hama dan patogen yang biasa lebih dikenal dengan pengendalian hayati. Pengendalian hayati dapat juga didefinisikan sebagai upaya pengurangan kepadatan inokulum atau pengurangan kegiatan patogen atau parasit, baik pada waktu aktif maupun dorman dengan menggunakan satu atau lebih organisme yang dilakukan secara alami melalui manipulasi lingkungan, inang (antagonis) serta melalui penambahan satu atau lebih antagonis (Cook and Baker, 1983).

Pengendalian penyakit tanaman secara hayati dalam arti luas adalah setiap cara pengendalian penyebab penyakit atau pengurangan jumlah atau pengaruh patogen tersebut yang berhubungan dengan mekanisme kehidupan organisme lain selain manusia (Campbell, 1989). Pengendalian hayati oleh bakteri antagonis dapat terjadi melalui satu atau beberapa mekanisme. Menurut Nurhayati (2011) terdapat tiga mekanisme agens pengendali hayati dalam mengendalikan patogen, yaitu hiperparasitisme, kompetisi, dan antibiosis.

1. Hiperparasitisme yaitu terjadi kerusakan patogen oleh senyawa atau zat yang dihasilkan oleh agens hayati seperti kitinase, selulase, dan enzim pelisis.
2. Kompetisi yaitu terjadi penekanan aktivitas patogen oleh agens hayati terhadap sumber-sumber terbatas seperti zat organik, zat anorganik, ruang, dan faktor pertumbuhan lain. Terjadi persaingan dalam mendapatkan ruang hidup dan hara seperti karbohidrat, nitrogen, dan vitamin.
3. Antibiosis yaitu penghambatan patogen dengan senyawa metabolit yang dihasilkan oleh agens hayati seperti enzim, senyawa volatile, dan senyawa antibiotik lainnya.

Contoh bakteri agens hayati yaitu *Bacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas fluorescens* dan Actinomycetes (Sadler, 2005). Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya membuktikan bahwa bakteri *Pseudomonas fluorescens* dapat mengendalikan *Rhizoctonia solani* pada tanaman jagung (Irwansyah, 2018). Terdapat juga penelitian yang membuktikan bahwa bakteri *Bacillus* sp. juga mampu mengendalikan penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai yang disebabkan oleh patogen *X. a. pv. glycines* (Salerno, 2003). Sehingga dari hasil penelitian sebelumnya, dilakukan pengembangan untuk mendapatkan bakteri antagonis dari limbah cair tahu yang mampu mengendalikan *X. a. pv. glycines*.

2.5 Mekanisme Penghambatan Bakteri

Mekanisme penghambatan bakteri merupakan penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri yang berupa kerusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya, merubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga terjadi keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, serta menghambat sintesis

asam nukleat dan protein Antibakteri juga dikenal dengan antibiotik, yaitu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain (Kusmiyati, 2007). Antibakteri dapat mengganggu pertumbuhan atau juga dapat mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme bakteri yang merugikan.

Senyawa antibakteri umumnya berasal dari golongan alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik, dan terpenoid (Pelchzar dan Chan (1988); Iqlima *et al.*, (2017). Mekanisme dari tiap senyawa antibakteri tersebut juga berbeda-beda. Mekanisme kerja alkanoid yaitu dengan menghambat enzim yang berperan dalam proses replikasi DNA sehingga bakteri tidak mampu melakukan pembelahan dan pertumbuhan bakteri terhambat (Ernawati dan Sari, 2011). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Rijayanti, 2014). Mekanisme kerja saponin yaitu dengan melakukan mekanisme penghambatan dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen dan dapat menghancurkan permeabilitas dinding sel bakteri dan menimbulkan kematian bakteri (Noer dan Nurhayati, 2006). Mekanime kerja fenolik yaitu dengan merusak dinding sel dan merusak enzim pada bakteri, sedangkan mekanisme kerja terpenoid yaitu dengan merusak membran sel (Retnowati, 2013).

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang, yang dimulai pada bulan Desember 2018 sampai bulan Mei 2019.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu cawan Petri, timbangan analitik, gelas ukur, pengaduk, autoklaf tipe HL-36 Ae Hiyarama, kompor listrik, mikroskop kamera OLYMPUS SZX7 series, sprayer, mortar dan pistil, cawan petri berdiameter 9cm, bunsen, jarum Ose, panci, pinset, tabung reaksi, pipet, botol media, mikropipet Vitlab dig 100-1000 μ l, mikrotube, stik L, dan *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) tipe H.S. 079S.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu limbah cair tahu yang berasal dari Pabrik Tahu "ADMA" di Jl. Arumba Tunggulwulung nomor 31 Malang, tanaman tembakau, tanaman kedelai sehat yang berumur 1 bulan, daun kedelai yang bergejala pustul, media *nutrient agar* (NA), media *yeast extract dextrose carbonat* (YDC), media oksidatif-fermentatif, aluminium foil, plastik *wrapping*, akuades steril, tisu steril, alkohol 70% dan 96%, KOH 3%, H₂O₂, safranin, kristal violet, parafin cair, kertas saring, kloroform, dan spirtus.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini terdiri pada beberapa tahapan yaitu : (1) isolasi dan identifikasi bakteri penyebab penyakit pustul bakteri, (2) eksplorasi dan seleksi bakteri limbah cair tahu, (3) uji penghambatan bakteri antagonis terhadap *X. a. pv. glycines* secara *in vitro*, (4) uji hipersensitif bakteri antagonis limbah cair tahu, (5) karakterisasi dan identifikasi sampai tingkat genus bakteri antagonis.

3.4 Pelaksanaan Metode Penelitian

3.4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Patogen *X. a. pv. glycines* dari Daun Kedelai

Pengambilan sampel daun yang sakit pada kedelai didapatkan dari UPT Pengembangan Benih Padi dan Palawija, Singosari, Malang. Daun tanaman kedelai

yang bergejala dipetik dan dimasukkan ke dalam kantong plastik, kemudian dimasukkan ke dalam kotak es untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium.

a. Isolasi dan Purifikasi Bakteri Patogen *X. a. pv. glycines*

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode Schaad *et al.*, (2001) yang dimodifikasi, yaitu sampel daun dipotong secara aseptik kurang lebih 1cm x 1cm kemudian disterilkan dengan menggunakan alkohol 70% dan akuades steril lalu ditiriskan dengan menggunakan tisu steril. Sampel daun yang telah disterilkan kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan pistil lalu diambil sebanyak 1 g dan disuspensi dengan 9 ml akuades steril. Hasil suspensi dilakukan pengenceran hingga 10^{-4} kemudian dari hasil pengenceran diambil 0,1 ml suspensi bakteri dan dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media NA, lalu diratakan dengan menggunakan stik L dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah bakteri diinkubasi, dilakukan purifikasi pada bakteri yang memiliki warna koloni kuning pada media NA di dalam cawan Petri dengan teknik penggoresan menggunakan jarum Ose.

b. Identifikasi dan Uji Patogenesitas Bakteri Patogen *X. a. pv. glycines*

Bakteri yang telah dipurifikasi kemudian diidentifikasi untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan bakteri *X. a. pv. glycines*. Bakteri diidentifikasi menggunakan metode Schaad *et al.*, (2001) yaitu dengan diuji secara biokimia dan fisiologi melalui serangkaian uji yang meliputi reaksi Gram yaitu uji KOH 3% dan uji pewarnaan Gram, uji oksidatif-fermentatif, dan pertumbuhan pada media YDC.

Pengujian patogenesitas dilakukan untuk mengetahui bakteri yang didapatkan dapat menimbulkan gejala penyakit pada tanaman inangnya. Uji patogenesitas dilakukan dengan cara mengambil bakteri *X. a. pv. glycines* yang berumur 48 jam setelah peremajaan, kemudian disuspensikan dalam 9 ml akuades steril. Sebanyak 3 daun muda dari tanaman kedelai yang berumur kurang lebih 1 bulan, dilukai dengan carborundum. Selanjutnya suspensi bakteri diinokulasi dengan cara dioleskan atau disemprotkan pada daun tanaman kedelai yang telah dilukai. Kemudian daun tanaman kedelai diselubungi dengan plastik bening selama 5 hari dan diamati gejala penyakit yang tampak untuk mengetahui gejala sesuai dengan penyakit pustul bakteri (Habazar *et al.*, 2012).

3.4.2 Eksplorasi Bakteri Limbah Cair Tahu

Pengambilan sampel limbah cair tahu yang dilakukan pada penelitian ini berasal dari pabrik tahu “ADMA” yang berada di Jl. Arumba Tunggulwulung nomor 31, Malang. Pengambilan sampel menggunakan botol kaca sebanyak 250 ml yang telah disterilkan lalu mengambil limbah cair tahu yang akan dibuang.

Isolasi bakteri dari limbah cair tahu dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat atau *dillution plate*. Sampel limbah cair tahu diambil sebanyak 1 ml kemudian disuspensi dengan akuades steril sebanyak 10 ml. Suspensi diambil sebanyak 1 ml untuk dilakukan pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-9} . Sebanyak 0,1 ml suspensi diambil dari pengenceran 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media *Nutrient Agar* (NA), lalu diratakan dengan menggunakan stik L dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Setelah 24-48 jam diinkubasi, koloni bakteri yang masih tercampur diamati bentuk koloni dan warna koloni. Koloni bakteri yang memiliki bentuk dan warna yang berbeda kemudian dilakukan purifikasi. Purifikasi dilakukan pada media NA di dalam cawan Petri dengan teknik penggoresan menggunakan jarum Ose. Tujuan dari purifikasi yaitu untuk mendapatkan koloni tunggal bakteri. Selanjutnya bakteri yang telah dipurifikasi dinkubasi selama 48 jam dan diamati bentuk, warna, elevasi, ukuran, tepi, dan permukaan (Waluyo, 2008).

3.4.3 Seleksi Bakteri Antagonis dari Limbah Cair Tahu terhadap *X. a. pv. glycines*

Seleksi bakteri antagonis dari limbah cair tahu terhadap bakteri patogen *X. a. pv. glycines* dilakukan dengan metode *spray* atau pengkabutan (Kawaguchi *et al.*, 2008). Seleksi bakteri dilakukan untuk menyeleksi bakteri limbah cair tahu yang telah ditemukan dan dapat bersifat antagonis terhadap bakteri patogen. Bakteri *X. a. pv. glycines* dan bakteri limbah cair tahu yang telah ditemukan diremajakan kembali sebelum digunakan pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang telah dibiakkan selama 24 jam diambil menggunakan jarum Ose untuk dibuat suspensi dengan menambahkan aquades steril sebanyak 1 ml. Kertas saring steril berdiameter 5 mm dimasukkan ke dalam 1 ml suspensi bakteri limbah cair tahu selama kurang lebih 1 menit kemudian ditiriskan pada tisu steril selama 2-5 jam. Kertas saring yang telah kering, kemudian ditanam pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah dilakukan inkubasi, kemudian dilakukan penambahan

kloroform pada tutup cawan petri dalam keadaan terbalik selama 1 jam yang berfungsi untuk mematikan sementara bakteri limbah cair tahu. Setelah itu, biakan dikabutkan (*spray*) dengan menggunakan suspensi bakteri 10 ml akuades steril dan 30 Ose bakteri *X. a. pv. glycines* dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil dari seleksi bakteri antagonis dapat dilihat melalui pengukuran zona hambat yaitu zona bening yang terbentuk dari bakteri antagonis dengan menggunakan penggaris. Bakteri antagonis yang memiliki kemampuan menghambat terbesar selanjutnya akan dipilih untuk pengujian selanjutnya.

3.4.4 Uji Penghambatan terhadap *X. a. pv. glycines* secara *in vitro*

Uji penghambatan bakteri antagonis dari limbah cair tahu terhadap *X. a. pv. glycines* yang bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri dari limbah cair tahu sebagai agens antagonis terhadap penyakit pustul bakteri pada kedelai. Bakteri antagonis limbah cair tahu yang telah diseleksi dipilih enam bakteri dengan kemampuan antagonis terbaik. Uji antagonis dilakukan dengan menggunakan metode *spray* atau pengkabutan (Kawaguchi *et al.*, 2008). Bakteri antagonis limbah cair tahu yang telah dibiakkan selama 24 jam diambil menggunakan jarum Ose untuk dibuat suspensi dengan menambahkan aquades steril sebanyak 1 ml. Kertas saring steril berdiameter 5 mm dimasukkan ke dalam 1 ml suspensi bakteri antagonis limbah cair tahu selama kurang lebih 1 menit kemudian ditiriskan pada tisu steril selama 2-5 jam. Kertas saring yang telah kering, kemudian ditanam pada posisi tengah pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah dilakukan inkubasi, kemudian dilakukan penambahan kloroform pada tutup cawan petri dalam keadaan terbalik selama 1 jam. Setelah itu, biakan dikabutkan (*spray*) dengan menggunakan suspensi bakteri 10 ml akuades steril dan 30 Ose bakteri *X. a. pv. glycines* dan diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri antagonis dengan menggunakan penggaris.

Pada uji antagonis secara *in vitro*, pengujian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan dan 4 ulangan (Tabel 1). Bakterisida yang digunakan yaitu Oxymicin 150/100 (Oxytetracylin 150 g, Streptomycin sulfat 100g). Masing-masing perlakuan diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam kemudian dilakukan pengukuran zona hambat yang terbentuk pada masing-masing perlakuan.

Tabel 1. Perlakuan uji penghambatan bakteri patogen *X.a. pv. glycines* secara *in vitro*.

Perlakuan	Keterangan
Perlakuan 1	Isolat bakteri A1
Perlakuan 2	Isolat bakteri A2
Perlakuan 3	Isolat bakteri A15
Perlakuan 4	Isolat bakteri C8
Perlakuan 5	Isolat bakteri D7
Perlakuan 6	Isolat bakteri D9
Perlakuan 7	Bakterisida Streptomisin 30 µl/ml (kontrol positif)
Perlakuan 8	Akuades (kontrol negatif)

3.4.5 Uji Hipersensitif Bakteri Antagonis Limbah Cair Tahu

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui bakteri antagonis dari limbah cair tahu yang diuji bersifat patogen atau tidak terhadap tanaman. Uji hipersensitif dilakukan dengan menginokulasikan bakteri hasil seleksi pada tanaman tembakau. Tanaman tembakau digunakan pada uji hipersensitif dikarenakan tanaman tembakau memiliki sifat yang rentan dan sensitif terhadap patogen daripada tanaman yang lain. Cara menginokulasikan bakteri pada tanaman tembakau dengan cara melukai daun tanaman tembakau menggunakan jarum suntik yang aseptik kemudian menginfiltrasikan suspensi bakteri. Suspensi yang digunakan berumur 24 jam sampai 72 jam setelah inokulasi. Jika pada bagian tanaman yang diinokulasi bakteri terjadi gejala nekrotis, maka bakteri tergolong ke dalam jenis bakteri patogen terhadap tanaman (Fahy and Persley, 1983).

3.4.6 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Hasil Antagonis

Bakteri antagonis dari limbah cair tahu diidentifikasi berdasarkan pada metode Schaad *et al.*, (2001) (Gambar 4) untuk mengetahui genus bakteri antagonis dari limbah cair tahu yang ditemukan. Metode identifikasi secara biokimia dan fisiologi yang digunakan meliputi uji gram, uji pewarnaan endospora, uji oksidatif-fermentatif, uji katalase, dan uji pertumbuhan pada media YDC.

a. Uji Gram

Pewarnaan Gram

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri berumur 24 jam dengan menggunakan jarum Ose kemudian diletakkan pada kaca preparat steril

yang sudah ditetesi akuades steril 1 tetes dan diratakan, lalu dikeringkan di atas bunsen. Setelah kering, ditetesi dengan larutan kristal violet 5% sebanyak 2-3 tetes didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian ditetesi dengan iodine sebanyak 1-2 tetes dan didiamkan selama 1 menit lalu disemprot dengan alkohol 70% dan didiamkan selama 20 detik, dibilas dengan air mengalir kemudian dikeringkan. Tahap terakhir yaitu isolat ditetesi dengan larutan safranin 0,15 dan didiamkan selama 20 detik kemudian dibilas dengan air mengalir. Isolat kemudian diamati dengan mikroskop. Bakteri yang menunjukkan warna ungu merupakan bakteri Gram positif, sedangkan bakteri yang menunjukkan warna merah merupakan bakteri Gram negatif (Hadioetomo, 1993).

Uji KOH 3%

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri dengan menggunakan jarum Ose dan diletakkan pada kaca preparat yang telah ditetesi KOH 3%. Suspensi bakteri pada kaca preparat kemudian ditarik-tarik dengan jarum Ose secara cepat dan berulang-ulang. Perlakuan dengan KOH 3% terhadap massa bakteri Gram negatif akan menyebabkan rusaknya dinding sel bakteri dan melepas DNA yang merupakan komponen bersifat viscid atau lendir. Bakteri Gram negatif akan nampak lendir saat diangkat atau ditarik, sedangkan bakteri dengan Gram positif akan tetap encer atau tidak menunjukkan reaksi yang spesifik (Lay, 1994).

b. Pewarnaan Endospora

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri berumur 48 jam dengan menggunakan jarum Ose kemudian diletakkan pada kaca preparat steril yang sudah ditetesi akuades steril 1 tetes dan diratakan, lalu dikeringkan di atas bunsen. Setelah kering ditetesi dengan dengan *malachite green* dan didiamkan selama 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di atas bunsen. Selanjutnya ditetesi safranin selama 15 detik lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di atas bunsen. Selanjutnya bakteri diamati dengan mikroskop. Spora bakteri akan tampak berwarna hijau, sedangkan sel bakteri akan tampak berwarna merah (Hadioetomo, 1993).

c. Uji Oksidatif-Fermentatif

Pengujian ini dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri yang termasuk dalam bakteri aerob atau anaerob. Bahan yang diperlukan untuk uji OF yaitu pepton 2g; NaCl 3g, agar 3g, bromotymol blue 1% 3 ml, dan KH_2PO_4 0,3 g. Seluruh bahan dilarutkan dan diatur pada pH 7,1, lalu dituang ke dalam tabung reaksi berdiameter 13 mm sebanyak 4,5 ml/tabung kemudian media disterilisasikan pada suhu 121°C selama 20 menit.

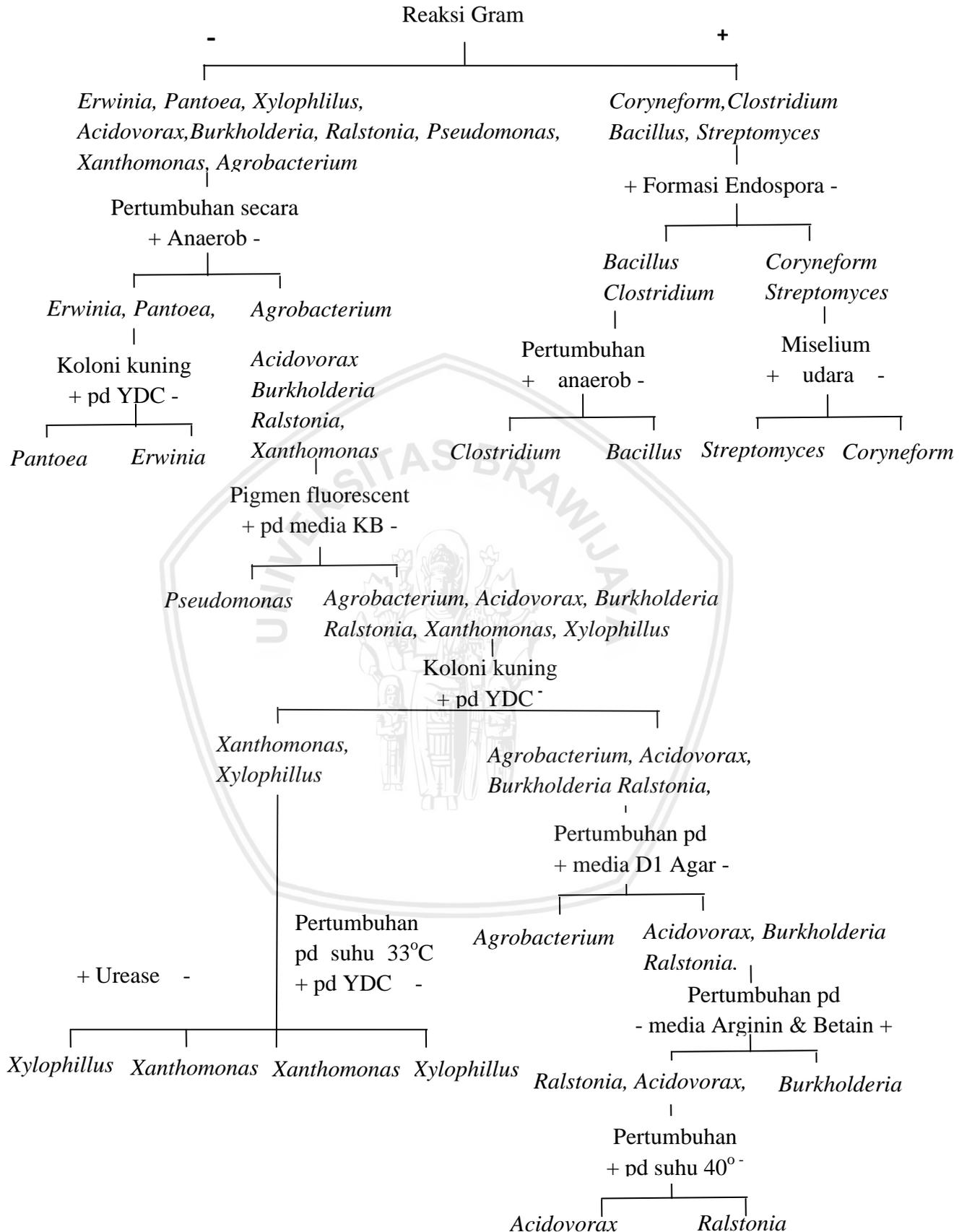
Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri dengan menusukkan pada 2 media dengan jarum Ose. Media yang digunakan yaitu media dengan penutup parafin cair sebanyak 2 ml (anaerob) dan media tanpa penutup parafin cair (aerob). Media diinkubasi pada suhu ruang dan diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna yang terjadi pada media OF akan menentukan kategori bakteri tersebut. Apabila pada media yang ditutup parafin terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning, mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob (reaksi fermentatif), sedangkan jika terjadi perubahan warna pada media yang tidak ditutup parafin maka mengindikasikan positif untuk pertumbuhan aerob (reaksi oksidatif) (Hadioetomo, 1993).

d. Uji Katalase

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri dengan menggunakan jarum Ose dan diletakkan pada kaca preparat dan ditetesi dengan H_2O_2 3%. Reaksi positif ditandai dengan adanya gelembung udara yang terbentuk karena bakteri yang diuji memiliki enzim katalase yang mampu mengubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993).

e. Pertumbuhan pada Media *Yeast Extract Dextrose Carbonat* (YDC)

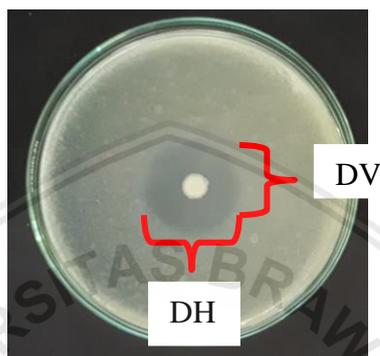
Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang masuk ke dalam genus *Xylophilus* dan *Xanthomonas*. Bakteri ditumbuhkan pada media selektif YDC, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam. Apabila bakteri uji bereaksi positif yaitu berwarna kuning, maka bakteri tersebut termasuk ke dalam genus *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001).



Gambar 4. Diagram pengujian bakteri hingga tingkat genus (Schaad *et al.*, 2001)

3.5 Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan yang diamati pada penelitian ini yaitu pengamatan zona hambat bakteri antagonis terhadap bakteri patogen *X. a. pv. glycines* secara *in vitro* atau yang dihasilkan pada media NA. Zona hambat yang terbentuk kemudian diukur diameternya menggunakan penggaris. Perhitungan zona hambat menggunakan rumus Wuryandari *et al.*, (2008), yaitu :



$$R = \frac{(Dv - 0.5) + (Dh - 0.5)}{2}$$

Keterangan :

R adalah rerata diameter zona hambat
 Dv adalah diameter zona hambat vertikal
 Dh adalah diameter zona hambat horizontal

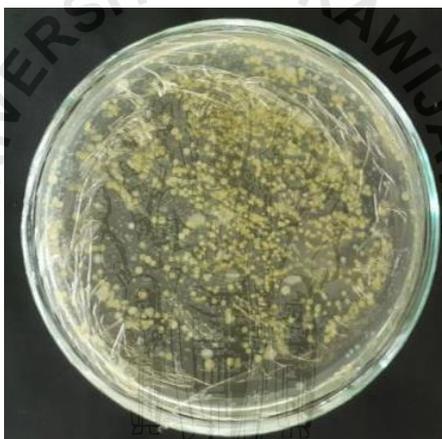
3.6 Analisis Data

Hasil pengamatan dianalisa menggunakan analisis ragam ANOVA dan apabila terdapat pengaruh atau perbedaan yang nyata, maka akan dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncon Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kesalahan 5%. Analisis data bertujuan untuk mengetahui kemampuan antagonis bakteri limbah cair tahu terhadap patogen *X. a. pv. glycines*.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakter dan Patogenesitas Bakteri Penyebab Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai

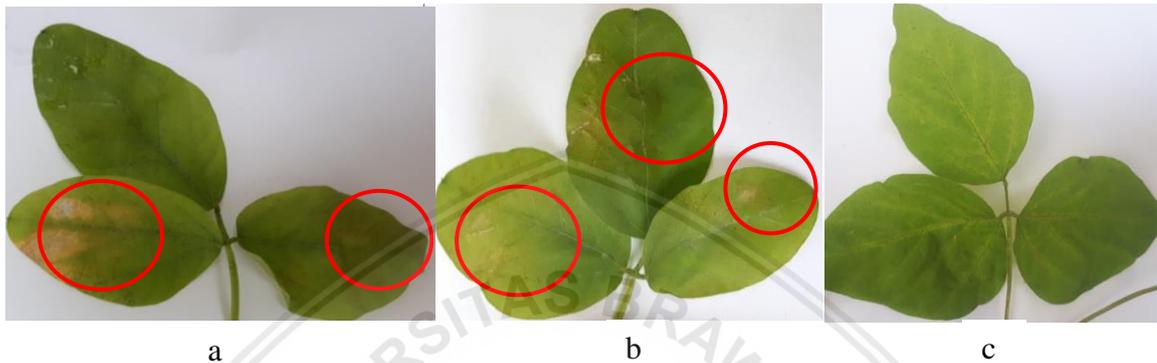
Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran yang kemudian ditumbuhkan pada media NA. Suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan pada media NA setelah diinkubasi 24-48 jam terdapat beberapa koloni bakteri yang berwarna kuning, berbentuk bulat dengan permukaan cembung (Gambar 5). Menurut Amaniyah (2015), bakteri *X. axonopodis* pv. *glycines* yang ditumbuhkan pada media NA berwarna kuning serta koloni tunggal yang berbentuk bulat dengan tepian halus. Dari hasil isolasi didapatkan 12 bakteri dengan morfologi berwarna kuning, berbentuk bulat, dan permukaan cembung.



Gambar 5. Pertumbuhan bakteri hasil isolasi pada media NA berumur 24 jam

Uji patogenesitas dilakukan pada tanaman kedelai sehat yang berumur kurang lebih 30 hst. Uji patogenesitas ini bertujuan untuk membuktikan bahwa 12 isolat bakteri yang didapatkan dapat menimbulkan gejala yang sama dengan gejala penyakit yang ditemukan sebelumnya. Pada pengujian ini, gejala muncul 5 hari setelah inokulasi. Gejala awal yaitu muncul bercak kecil berwarna kekuningan dan bercak berkembang menjadi lebih besar serta pada bagian bawah daun terdapat tonjolan. Selanjutnya bercak akan mengering dan daun akan sobek (Gambar 6a). Hal ini sesuai dengan pernyataan Janse (2005), gejala pertama pada penyakit pustul bakteri yaitu terdapat bintik kecil berwarna hijau terang hingga kecoklatan dan terdapat benjolan ditengahnya. Benjolan tersebut akan mengerut dan berkembang menjadi bintik yang tidak beraturan dan berubah menjadi warna kuning. Penyakit

ini dapat menyebabkan perubahan warna daun menjadi kuning karena menyerang pada jaringan daun. Pada daun yang telah timbul bercak akan mudah robek sehingga daun akan berlubang. Dari 12 isolat yang dilakukan uji patogenesis terdapat 2 isolat yang menimbulkan gejala penyakit pustul pada kedelai yaitu bakteri dengan kode XA 35 dan XA 36. Selanjutnya dilakukan uji lanjut terhadap kedua bakteri tersebut.



Gambar 6. Gejala penyakit pustul bakteri dari hasil uji patogenesis 5 hari setelah inokulasi. (a: isolat kode XA 35, b: isolat kode XA 36, c: kontrol dengan carborundum)

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui bakteri yang diduga bakteri patogen penyebab penyakit pustul bakteri termasuk dalam kategori patogen atau bukan patogen. Uji hipersensitif dilakukan pada tanaman tembakau. Hasil uji hipersensitif pada 2 isolat bakteri dengan kode XA 36 dan XA 35 menunjukkan gejala nekrotik pada daun tembakau (Gambar 7). Menurut Yanti *et al.*, (2013) bakteri *X. axonopodis* pv. *glycines* yang diinokulasikan pada daun tanaman tembakau akan menyebabkan daun menguning atau menimbulkan gejala nekrotik.



Gambar 7. Gejala nekrotik pada daun tanaman tembakau 48 jam setelah inokulasi. (a: isolat kode XA 35, b: isolat kode XA 36)

Karakter Fisiologi dan Biokimia

Identifikasi karakterisasi fisiologi dan biokimia isolat bakteri XA 35 dan XA 36 dilakukan berdasarkan metode Schaad *et al.*, (2001) yaitu dengan uji gram seperti pewarnaan gram dan uji KOH 3%, uji pada media oksidatif-fermentatif (OF), dan uji pertumbuhan pada media *Yeast Extract Dextrose Carbonat* (YDC) (Tabel 2).

Tabel 2. Karakteristik Morfologi, Fisiologi dan Biokimia bakteri yang bergejala pustul bakteri

Karakteristik	Isolat		<i>Xanthomonas</i> (Schaad <i>et al.</i> , 2001)
	XA 35	XA 36	
Uji KOH	Negatif	Negatif	Negatif
Pewarnaan Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Uji OF	Oksidatif	Oksidatif	Oksidatif
Uji media YDC	Kuning	Kuning	Kuning
Uji media YDC suhu 33°C	Kuning	Kuning	Kuning
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang
Uji patogenesitas	Pustul	Pustul	
Uji hipersensitif	Positif	Positif	
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	
Warna koloni	Kuning	Kuning	
Tepi koloni	Rata	Rata	
Elevasi koloni	Cembung	Cembung	

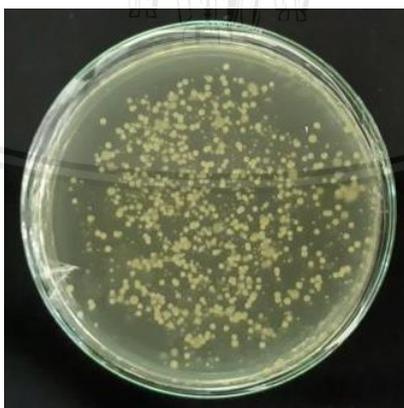
Hasil identifikasi dari uji fisiologis dan biokimia pada isolat bakteri XA 35 dan XA 36 (Tabel 2) sesuai dengan yang dikemukakan Schaad *et al.*, (2001) yaitu karakter dari bakteri genus *Xanthomonas* bereaksi negatif pada uji KOH 3%, pewarnaan Gram menunjukkan warna merah sehingga bereaksi negatif, pada uji oksidatif-fermentatif bereaksi oksdatif, uji pada media YDC yang bereaksi positif yaitu koloni bakteri berwarna kuning kemudian dilanjutkan dengan uji pada media YDC dengan suhu 33°C yang juga bereaksi positif. Pada uji patogenesitas menunjukkan reaksi positif dengan menunjukkan gejala penyakit pustul bakteri pada tanaman kedelai. Pada uji hipersensitif juga menunjukkan gejala nekrotik pada daun tembakau. Sehingga hasil identifikasi yang telah didapatkan dapat menjadi landasan bahwa bakteri yang ditemukan merupakan bakteri genus *Xanthomonas*.

Karakter Morfologi

Pengamatan morfologi isolat bakteri XA 35 dan XA 36 dilakukan pada koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam pada media NA. Pengamatan morfologi koloni bakteri ini meliputi bentuk, warna, tepian, dan kenaikan permukaan (elevasi). Pada pengamatan morfologi koloni dan morfologi sel bakteri (Tabel 2), diperoleh hasil yaitu koloni memiliki bentuk bulat, berwarna kuning, memiliki tepian yang rata, elevasi cembung, dan sel bakteri berbentuk batang. Hal ini sesuai dengan Khaeruni *et al.*, (2008), yaitu isolat *X. a. pv glycines* memiliki ciri-ciri yaitu, koloni berbentuk bulat dengan pinggiran rata, permukaan koloni konveks, licin, mengkilat, berwarna kuning serta mikroskopik pada bakteri ini yaitu sel berbentuk batang.

4.2 Hasil Eksplorasi Bakteri Limbah Cair Tahu

Hasil eksplorasi bakteri pada limbah cair tahu diamati bentuk dan warna koloni bakteri. Hasilnya didapatkan sebanyak 60 isolat bakteri dengan karakteristik morfologi koloni yang berbeda (Gambar 8). Keragaman bakteri yang didapat karena pada limbah cair tahu terdapat nutrisi yang tersedia dan dibutuhkan bakteri untuk berkembang. Menurut Megasari *et al.*, (2012), sangat beragamnya jenis bakteri dan mikroba disebabkan perkembangan secara alami jenis mikroba pada limbah.



Gambar 8. Pertumbuhan bakteri dari limbah cair tahu pada pengenceran 10^{-9} berumur 24 jam pada media NA

Seleksi bakteri antagonis dari limbah cair tahu terhadap bakteri patogen *X. a. pv. glycines* dilakukan dengan menggunakan metode pengkabutan atau *spray* (Kawaguchi *et al.*, 2008). Bakteri limbah cair tahu yang berpotensi antagonis

ditandai dengan adanya zona hambat berupa zona hambat pada sekitar bakteri limbah cair tahu.

Tabel 3. Rerata diameter zona hambat hasil seleksi bakteri limbah cair tahu yang bersifat antagonis terhadap bakteri *X. a. pv. glycines* setelah 24 jam inokulasi

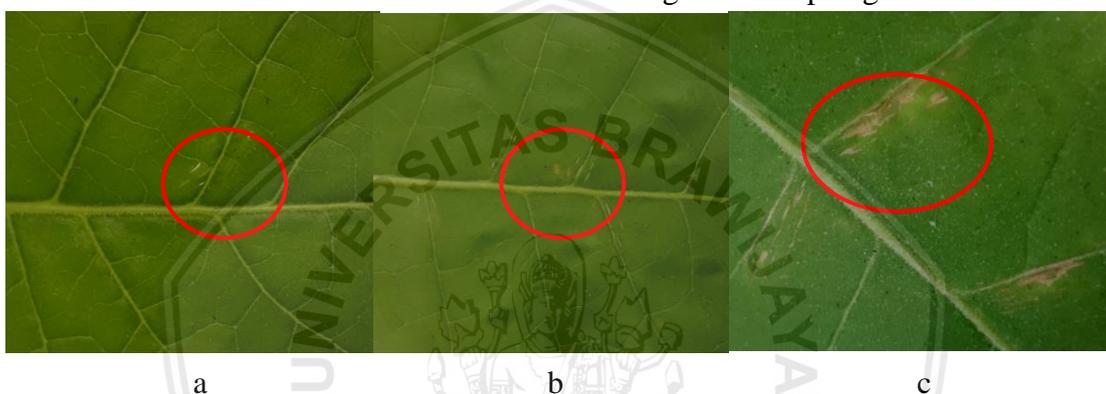
Kode Isolat	Rerata diameter zona hambat (cm)	Kode Isolat	Rerata diameter zona hambat (cm)	Kode Isolat	Rerata diameter zona hambat (cm)
A1*	1,35	B2	0,00	C13	0,00
A2*	1,10	B3	0,00	C14	0,00
A3	0,00	B4	0,00	D1	0,35
A4	0,70	B5	0,20	D2	0,20
A5	0,25	B6	0,25	D3	0,25
A6	0,00	B7	0,00	D4	0,25
A7	1,00	B8	0,00	D5	0,70
A8	0,50	B9	0,20	D6	1,0
A9	0,20	C1	0,00	D7*	1,4
A10	0,00	C2	0,00	D8	0,45
A11	0,25	C3	0,00	D9*	1,75
A12	0,75	C4	0,00	D10	0,20
A13	0,55	C5	0,00	D11	0,30
A14	0,20	C6	0,70	D12	0,00
A15*	1,15	C7	0,45	D13	0,00
A16	0,00	C8*	1,35	D14	0,00
A17	0,00	C9	0,00	D15	0,00
A18	0,00	C10	0,00	D16	0,00
A19	0,30	C11	0,00	D17	0,20
B1	0,00	C12	0,20	D18	0,25

Keterangan : (*) isolat yang digunakan pada pengujian selanjutnya

Hasil seleksi menunjukkan, dari 60 isolat bakteri limbah cair tahu, terdapat 33 isolat bakteri yang berpotensi antagonis terhadap bakteri patogen *X. a. pv. glycines* (Tabel 3). Tiga puluh tiga bakteri yang berpotensi antagonis mampu mengeluarkan zona hambat berupa zona hambat diantara bakteri tersebut. Selanjutnya zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri antagonis dihitung menggunakan rumus Wuryandari *et al.*, (2008) kemudian dipilih 6 isolat bakteri dengan zona hambat yang terbesar. Enam isolat bakteri yang terpilih yaitu isolat A1, A2, A15, C8, D7, dan D9. Selanjutnya isolat bakteri yang terpilih akan dilakukan pengujian selanjutnya.

4.3 Hasil Uji Hipersensitif Bakteri Antagonis Limbah Cair Tahu

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui bakteri antagonis limbah cair tahu termasuk dalam kategori patogen atau bukan patogen. Uji hipersensitif dilakukan pada daun tanaman tembakau. Hasil uji hipersensitif pada 6 isolat bakteri antagonis limbah cair tahu tidak menunjukkan adanya gejala nekrotik pada area yang telah diinkulasikan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri antagonis limbah cair tahu tidak termasuk ke dalam kategori bakteri patogen. Menurut Agrios (2005), perubahan warna nekrotik pada titik yang telah diinokulasikan bakteri menandakan bahwa bakteri tersebut bersifat sebagai bakteri patogen tanaman.



Gambar 9. Hasil uji hipersensitif pada daun tembakau 48 jam setelah inokulasi. (a: bakteri antagonis limbah cair tahu kode D7 pada daun tembakau tidak menunjukkan gejala nekrotik, b: kontrol akuades tidak menunjukkan gejala nekrotik, c: kontrol bakteri patogen menunjukkan gejala nekrotik)

4.4 Penghambatan Bakteri Antagonis terhadap *X. a. pv. glycines* secara *in vitro*

Pengujian penghambatan bakteri antagonis limbah cair tahu terhadap bakteri patogen *X. a. pv. glycines* secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan enam isolat terpilih yaitu isolat AI, A2, A15, C8, D7, dan D9 serta kontrol positif menggunakan bakterisida Streptomycin sulfat dan kontrol negatif menggunakan akuades steril. Penghambatan pertumbuhan bakteri *X. a. pv. glycines* dapat dilihat dari zona hambat yang muncul.

Tabel 4. Rerata diameter zona hambat bakteri antagonis terhadap pertumbuhan bakteri *X. a. pv. glycines*

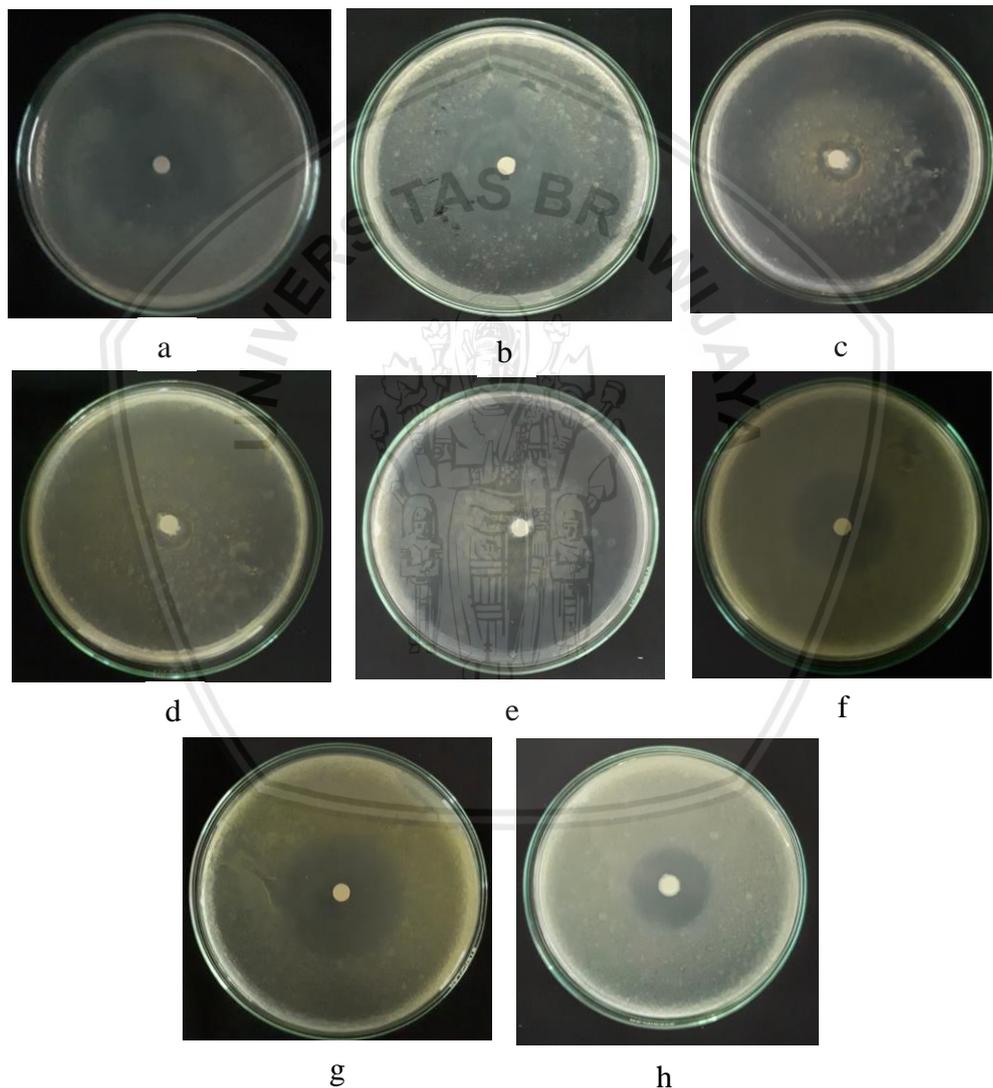
Perlakuan	Rerata diameter zona hambat (cm) pada pengamatan ke-		
	24 JSI	48 JSI	72 JSI
Streptomycin sulfat	3,26 e	3,26 d	3,13 d
Akuades steril	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Isolat A1	0,45 ab	0,49 ab	0,43 ab
Isolat A2	0,83 abc	0,70 ab	0,66 ab
Isolat A15	0,84 abc	0,76 ab	0,83 ab
Isolat C8	1,25 bcd	1,16 bc	1,10 bc
Isolat D7	1,90 d	1,80 c	1,70 c
Isolat D9	1,50 c	1,60 c	1,50 c

Keterangan : Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%. JSI : jam setelah inokulasi

Hasil uji penghambatan dari 6 bakteri antagonis limbah cair tahu tersebut mampu menghasilkan zona hambat (Gambar 10). Zona hambat yang terbentuk menunjukkan bahwa pada masing-masing bakteri antagonis memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *X. a. pv. glycines*. Kemampuan menghambat bakteri antagonis tersebut diduga karena bakteri memiliki senyawa antibiotik yang mampu menghambat atau membunuh bakteri patogen. Menurut Wright *et al.*, (2011) mikroba khususnya bakteri memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba lain disebabkan bakteri dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti senyawa antimikroba serta antibiotik.

Berdasarkan hasil analisis ragam pada 24 JSI, 48 JSI, dan 72 JSI menunjukkan zona hambat yang berpengaruh nyata dalam menghambat pertumbuhan bakteri *X. a. pv. glycines*. Pada uji penghambatan 24 JSI, 48 JSI, dan 72 JSI menunjukkan hasil rerata zona hambat yang berbeda-beda antar perlakuan (Tabel 4). Pada pengamatan 72 JSI, rerata zona hambat bakteri yang terbesar terjadi pada isolat bakteri C8, D7, dan D9, sedangkan zona hambat terkecil terjadi pada isolat bakteri A1, A2, dan A15. Hal ini menunjukkan bahwa antar bakteri antagonis limbah cair tahu memiliki kemampuan daya hambat yang berbeda-beda. Perbedaan pada kemampuan bakteri antagonis dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dapat terjadi karena perbedaan senyawa metabolit yang dihasilkan. Menurut Lestari (2013), perbedaan zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri antagonis disebabkan karena bakteri menghasilkan senyawa metabolit yang berbeda, konsentrasi zat bioaktif serta jenis zat yang dihasilkan bakteri juga dapat mempengaruhi. Selain itu, fase pertumbuhan

bakteri yang fluktuatif juga mempengaruhi kemampuan bakteri antagonis dalam menghambat bakteri patogen. Menurut Brock and Madigan (1991), fase pertumbuhan bakteri dimulai dari fase lag yaitu fase penyesuaian bakteri. Selanjutnya, fase pertumbuhan eksponensial yaitu fase bakteri dalam pertumbuhan yang seimbang sehingga konsentrasi metabolit tetap konstan. Selanjutnya, fase stasioner, jumlah dari sel hidup dan sel mati sama sehingga jumlah sel tetap konstan. Fase yang terakhir yaitu fase kematian, pada fase ini populasi bakteri menurun dan kemampuan metabolit pada bakteri sudah jauh berkurang.



Gambar 10. Penghambatan bakteri antagonis terhadap bakteri *X. a pv. glycines* secara *in vitro* pada media NA selama 24 jam. (a: perlakuan kontrol Strptomycin sulfat, b: perlakuan kontrol akuades steril, c: perlakuan bakteri A1, d: perlakuan bakteri A2, e: perlakuan bakteri A15, f: perlakuan bakteri C8, g: perlakuan bakteri D7, h: perlakuan bakteri D9)

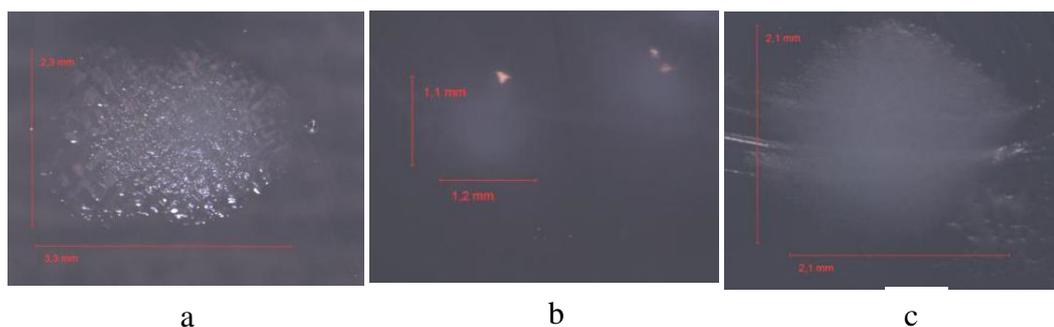
Hasil uji lanjut DMRT pada pengamatan 72 JSI, perlakuan keenam isolat bakteri apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol akuades steril menunjukkan hasil rerata zona hambat keenam isolat bakteri lebih baik karena pada kontrol akuades steril tidak menunjukkan interaksi penghambatan. Namun hasil rerata diameter zona hambat isolat A1, A2, dan A15 tidak berbeda nyata terhadap kontrol akuades steril. Sedangkan, apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol bakterisida Streptomycin menunjukkan hasil rerata zona hambat keenam isolat bakteri berbeda nyata namun, masih lebih rendah apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol Streptomycin. Streptomycin merupakan antibiotik yang berasal dari golongan aminoglikosida yang bersifat membunuh bakteri. Antibiotik golongan tersebut bekerja melalui penghambatan sintesis protein dengan cara menghambat fungsi ribosom atau sintesis protein (Brooks *et al.*, 2010).

Hasil pengamatan pada 72 JSI menunjukkan rerata diameter zona hambat yang tertinggi didapatkan pada isolat C8, D7, dan D9. Sedangkan hasil rerata diameter zona hambat terendah yaitu pada isolat A1, A2, dan A15. Hasil rerata diameter zona hambat isolat bakteri A1 tidak berbeda nyata apabila dibandingkan dengan isolat bakteri A2 dan A15 sehingga ketiga isolat memiliki kemampuan penghambatan yang sama, namun berbeda nyata apabila dibandingkan dengan isolat bakteri C8, D7 dan D9. Hasil rerata diameter zona hambat pada keenam bakteri antagonis relatif menurun. Menurut Widiyanti *et al.*, (2018) berkurangnya tingkat penghambatan oleh isolat bakteri disebabkan senyawa metabolit yang telah menguap atau semakin lama efeknya akan berkurang sehingga mikroba lain akan tumbuh tanpa adanya hambatan.

4.5 Karakter dan Identifikasi Bakteri Antagonis

Karakter Morfologi Bakteri

Enam bakteri antagonis limbah cair tahu yang telah terpilih, selanjutnya dilakukan pengamatan karakteristik bakteri secara morfologi (Gambar 11). Pada karakteristik morfologi pengamatan meliputi bentuk, elevasi, warna, tepi dan bentuk sel (Tabel 5).



Gambar 11. Koloni tunggal bakteri antagonis. (a: isolat A1, b: isolat A15, c: isolat D7)

Hasil karakter bakteri secara morfologi menunjukkan bahwa semua koloni berbentuk bulat dan sel bakteri berbentuk batang. Warna koloni didominasi warna putih susu (A1, A2, A15). Terdapat juga koloni yang berwarna putih bening (D7, D9) dan berwarna putih keruh (C8). Bentuk elevasi didominasi elevasi cembung dan hanya 1 bakteri (C8) yang memiliki elevasi rata. Tepian bakteri didominasi tepian rata dan hanya dua bakteri (A1, A2) yang memiliki tepian bergerigi.

Tabel 5. Karakteristik morfologi, fisiologi, dan biokimia bakteri antagonis

Karakteristik	Isolat					
	A1	A2	A15	C8	D7	D9
Bentuk	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung	Rata
Warna	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih keruh	Putih bening	Putih bening
Tepi	Bergerigi	Bergerigi	Rata	Rata	Rata	Rata
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
Uji KOH 3%	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
Pewarnaan Gram	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
Uji OF	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif
Pewarnaan spora	Tidak uji	Berspora	Berspora	Tidak uji	Tidak uji	Tidak uji
Uji Media YDC	Kuning	Tidak uji	Tidak uji	Putih	Kuning	Kuning
Genus	<i>Pantoea</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>

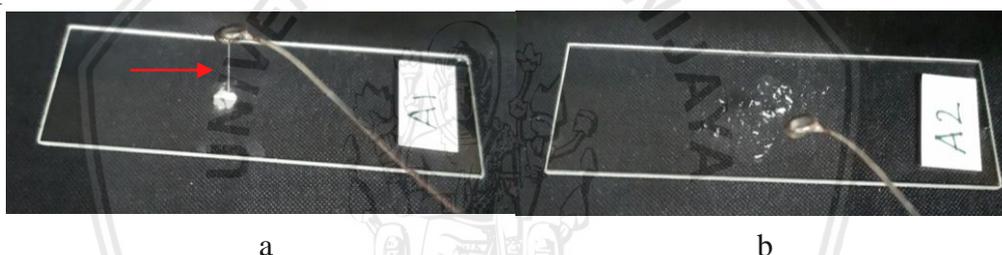
Karakter Fisiologi dan Biokimia Bakteri

Bakteri antagonis limbah cair tahu terpilih yaitu 6 isolat bakteri selanjutnya dilakukan karakterisasi lanjut secara fisiologi dan biokimia berdasarkan Schaad *et al.*, (2001) (Tabel 5). Pada karakteristik fisiologi dan biokimia pengamatan

meliputi uji gram, uji KOH, uji pada media oksidatif-fermentatif, pewarnaan spora, dan uji pada media YDC.

1. Uji Gram

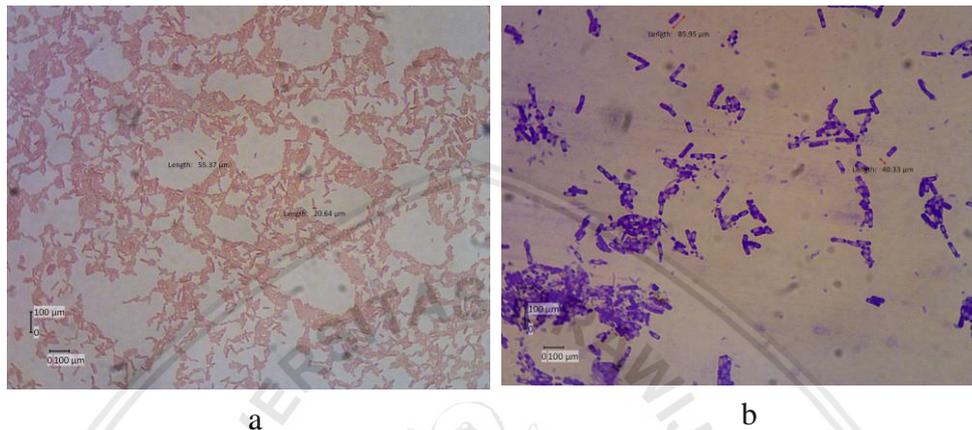
Uji Gram dilakukan dengan menggunakan KOH 3% dan pewarnaan Gram. Pada uji KOH 3% bakteri yang telah ditetesi KOH 3% pada kaca preparat yang setelah diangkat dengan jarum Ose terdapat lendir maka bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif, sedangkan bakteri yang tidak berlendir merupakan bakteri Gram positif (Gambar 12). Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat bakteri A1, C8, D7, dan D9 menunjukkan lendir, sedangkan isolat bakteri A2 dan A15 tidak menunjukkan lendir. Hal tersebut sesuai dengan Schaad *et al.*, (2001) yaitu pada pengujian KOH 3% bakteri Gram negatif akan tampak berlendir jika diangkat dengan jarum Ose, sedangkan bakteri Gram positif akan tampak tidak berlendir.



Gambar 12. Hasil uji KOH 3% pada bakteri antagonis. (a: bakteri yang menghasilkan lendir isolat A1, b: bakteri yang tidak menghasilkan lendir isolat A2)

Pada uji pewarnaan Gram, bakteri akan menunjukkan perbedaan warna. Bakteri Gram negatif akan menunjukkan warna merah, sedangkan bakteri Gram positif akan menunjukkan warna ungu sampai biru (Gambar 13). Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat bakteri A1, C8, D7, dan D9 menunjukkan warna merah pada hasil pewarnaan Gram sehingga termasuk kelompok bakteri Gram negatif. Pada isolat bakteri A2 dan A15 menunjukkan warna ungu kebiruan pada hasil pewarnaan Gram, sehingga bakteri termasuk pada kelompok Gram positif. Hal tersebut sesuai dengan Schaad *et al.*, (2001) yaitu untuk bakteri Gram negatif akan memunculkan warna merah sedangkan bakteri Gram positif akan menunjukkan warna biru keunguan. Perbedaan warna yang muncul disebabkan oleh bakteri Gram positif memiliki lapisan dinding yang tipis dan dilapisi peptidoglikan dibandingkan dengan bakteri Gram negatif yang tersusun dari lipid

yang tinggi (Lay, 1994). Perbedaan penyusun lapisan dinding bakteri tersebut dapat mempengaruhi sensitifitas permeabilitas bakteri. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu karena kompleks zat warna kristal violet tetap dipertahankan meskipun diberi larutan alkohol, namun bakteri Gram negatif akan berwarna merah karena kompleks zat akan larut pada saat pemberian alkohol sehingga warna merah safranin yang dipertahankan (Nurhidayati *et al.*, 2015).

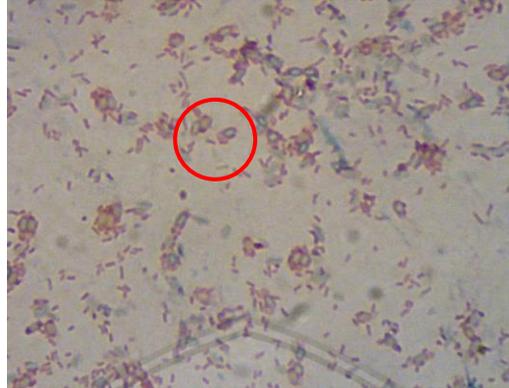


Gambar 13. Hasil pewarnaan Gram bakteri antagonis. (a: isolat bakteri D7 menghasilkan warna merah, b: isolat bakteri A15 menghasilkan warna biru keunguan)

2. Pewarnaan Spora

Pengujian pewarnaan spora dilakukan pada bakteri yang termasuk bakteri Gram positif. Hasil pengujian gram menunjukkan bahwa bakteri A2 dan A15 termasuk bakteri Gram positif sehingga dilakukan pewarnaan spora untuk mengetahui bakteri tersebut menghasilkan spora atau tidak. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat bakteri A2 dan A15 memunculkan warna hijau yang berarti bakteri memiliki endospora (Gambar 14). Menurut Rezki (2018), bakteri penghasil spora tahan akan pewarnaan. Bakteri penghasil spora akan mengikat senyawa pewarna yaitu *malachite green*, sehingga warna spora bakteri adalah hijau. Bakteri yang tidak memiliki spora bersifat tidak tahan terhadap pewarnaan karena hanya memiliki sel vegetatif. Saat dilakukan pewarnaan dengan *malachite green*, sel vegetatif mampu berikatan dengan zat pewarna namun akan luntur setelah dilakukan pencucian. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan safranin yang berwarna merah dan sel vegetatif akan berikatan dengan zat pewarna sehingga pada saat diamati dengan menggunakan mikroskop, sel vegetatif akan berwarna merah.

Menurut Schaad *et al.*, (2001), bakteri yang berspora akan masuk ke dalam genus *Clostridium* atau *Bacillus*.



Gambar 14. Isolat bakteri A2 yang memiliki spora

3. Uji Katalase

Pengujian katalase dilakukan dengan meneteskan larutan H_2O_2 pada kaca preparat yang terdapat isolat bakteri antagonis. Hasil pengujian menunjukkan bahwa keenam isolat bakteri antagonis menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan adanya gelembung setelah ditetesi larutan H_2O_2 (Gambar 15). Adanya gelembung menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase. Menurut Yustianita (2015), gelembung terbentuk akibat adanya enzim yang dihasilkan oleh bakteri berupa enzim katalase. Enzim tersebut akan menguraikan H_2O_2 menjadi oksigen dan air.



Gambar 15. Uji katalase dengan reaksi positif isolat C8

4. Uji Oksidatif-Fermentatif

Pengujian oksidatif-fermentatif dilakukan pada keenam isolat bakteri. Pada pengujian ini dilakukan dengan dua perlakuan yaitu media OF yang telah diinokulasikan bakteri antagonis dengan ditutup parafin cair (anaerob) dan tanpa ditutup parafin cair (aerob). Hasil pengujian menunjukkan perubahan warna dari biru menjadi kuning pada kedua media OF dengan ditutup parafin cair maupun tanpa ditutup parafin cair sehingga keenam bakteri antagonis bersifat fermentatif

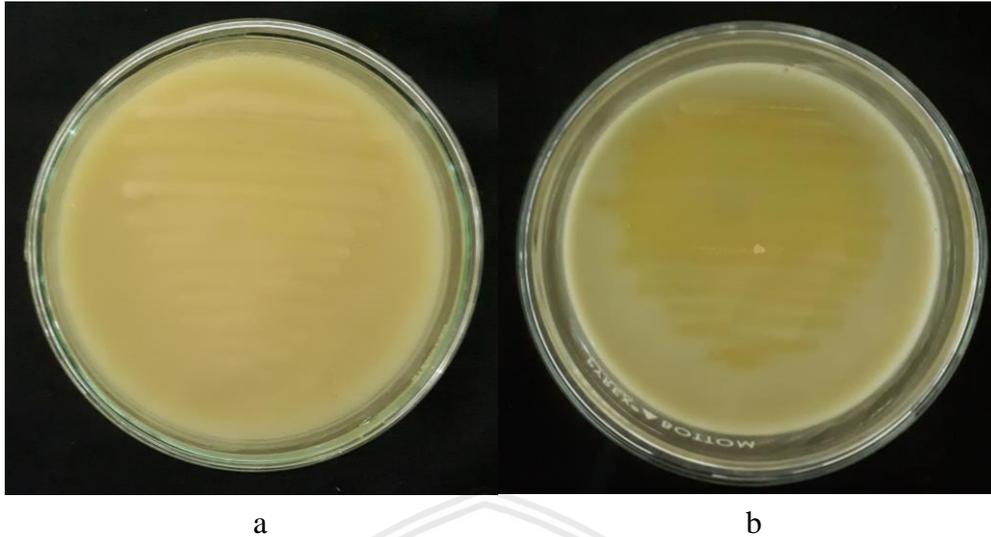
(Gambar 16). Pada media OF dengan perlakuan kontrol tanpa inokulasi bakteri, media OF tidak berubah warna atau tetap berwarna biru. Menurut Lay (1994), mikroorganisme yang melakukan metabolisme karbohidrat ditunjukkan oleh perubahan warna media dari biru menjadi kuning. Pada media yang ditutup dengan parafin, apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning maka mikroorganisme tersebut memetabolisme karbohidrat secara fermentatif. Namun, apabila pada media yang tidak ditutup parafin terjadi perubahan warna media dari biru menjadi kuning, maka menunjukkan mikroorganisme tersebut memetabolisme karbohidrat secara oksidatif.



Gambar 16. Hasil uji oksidatif-fermentatif (OF) isolat A15. (a: bakteri antagonis dengan parafin cair; b: bakteri antagonis tanpa parafin cair; c: kontrol dengan parafin cair; d: kontrol tanpa parafin cair)

5. Pengujian pada media YDC

Pengujian pada media YDC dilakukan pada isolat bakteri A1, C8, D7, dan D9. Pengujian dilakukan dengan melakukan metode *streak* isolat bakteri antagonis pada media YDC. Hasil pengujian yang didapatkan yaitu pada isolat bakteri D7 pertumbuhan koloni berwarna kuning, sedangkan pada isolat bakteri A1, C8, dan D9 pertumbuhan koloni berwarna putih (Gambar 17). Menurut Schaad *et al.*, (2001) bakteri dengan reaksi positif yaitu koloni bakteri berwarna kuning merupakan genus *Pantoea*, sedangkan bakteri dengan reaksi negatif yaitu koloni bakteri berwarna putih merupakan genus *Erwinia*.



Gambar 17. Pertumbuhan bakteri pada media YDC selama 24 jam. (a: koloni bakteri berwarna putih, b: koloni bakteri berwarna kuning)

Hasil Identifikasi

Identifikasi keenam bakteri antagonis limbah cair tahu dilakukan secara morfologi serta fisiologi dan biokimia berdasarkan metode Schaad *et al.*, (2001) memiliki karakter yang bervariasi. Hasil yang didapatkan yaitu 3 isolat bakteri termasuk ke dalam genus *Pantoea*, 2 isolat bakteri termasuk ke dalam genus *Clostridium*, dan 1 isolat bakteri termasuk ke dalam genus *Erwinia*.

1. Genus *Pantoea*

Berdasarkan karakteristik morfologi isolat bakteri A1, D7, dan D9 memiliki bentuk koloni yaitu bulat dan sel berbentuk batang. Elevasi pada isolat bakteri A1 dan D7 cembung, sedangkan elevasi isolat D9 rata. Warna koloni isolat A1 yaitu putih susu, sedangkan isolat D7 dan D9 putih bening. Tepian pada isolat A1 bergerigi, sedangkan tepian isolat D7 dan D9 rata. Berdasarkan uji fisiologi dan biokimia diketahui bahwa isolat dengan kode A1, D7, dan D9 termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram negatif yang dicirikan bakteri menghasilkan lendir pada saat pengujian KOH 3% dan pada uji pewarnaan Gram menunjukkan warna merah. Bakteri tersebut memiliki sel berbentuk batang, bersifat fermentatif, dan koloni berwarna kuning pada media YDC. Menurut Schaad *et al.*, (2001) bakteri dengan karakteristik tersebut termasuk ke dalam genus *Pantoea* sp.

Menurut Ozaktan dan Bora (2004), bakteri *Pantoea agglomerans* dapat bersifat antagonis terhadap patogen *Erwinia amylovora*. Mekanisme antagonis

pada bakteri ini yaitu dengan persaingan ruang dan nutrisi sehingga membatasi pertumbuhan bakteri patogen. Menurut Pusey (2002), bakteri *Pantoea* merupakan salah satu bakteri yang berpotensi sebagai agens antagonis.

2. Genus *Clostridium*

Berdasarkan karakteristik morfologi isolat bakteri A2 dan A15 memiliki bentuk koloni yaitu bulat dan sel berbentuk batang. Elevasi pada kedua isolat yaitu cembung. Warna koloni pada kedua isolat yaitu putih susu. Tepian pada isolat A2 bergerigi, sedangkan pada isolat A15 tepian rata. Berdasarkan hasil uji fisiologi dan biokimia diketahui bahwa isolat dengan kode A2 dan A15 termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram positif yang dicirikan bakteri tidak menghasilkan lendir pada saat pengujian KOH 3% dan pada uji pewarnaan gram memunculkan warna biru keunguan. Kedua bakteri tersebut memiliki sel berbentuk batang, bersifat fermentatif, dan menghasilkan spora pada saat pewarnaan spora. Menurut Schaad *et al.*, (2001) bakteri dengan karakteristik tersebut termasuk ke dalam genus *Clostridium*.

Menurut Luthfiyyah (2016), bakteri genus *Clostridium* mampu bersifat antagonis terhadap patogen dengan genus *Xanthomonas*. Penghambatan ditunjukkan dengan adanya zona bening atau zona hambat pada sekitar kertas saring pada saat pengujian. Menurut Ariyanti *et al.*, (2016) isolat bakteri *Clostridium* sp. memiliki aktivitas HCN (asam sianida) yang tinggi. Senyawa HCN merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri antagonis yang mampu menghambat bakteri patogen (Ryder *et al.*, 1994). Senyawa HCN yang masuk ke dalam sel bakteri akan bersifat toksik dan mengganggu proses metabolisme dalam sel kemudian mematikan sel (Lenny, 2006).

3. Genus *Erwinia*

Berdasarkan karakteristik morfologi isolat bakteri C8 memiliki bentuk koloni yaitu bulat dan sel berbentuk batang. Elevasi pada isolat bakteri C8 yaitu cembung. Warna koloni pada isolat bakteri C8 yaitu putih keruh. Tepian pada isolat C8 yaitu rata. Berdasarkan uji fisiologi dan biokimia diketahui bahwa isolat bakteri dengan kode C8 termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram negatif yang dicirikan bakteri menghasilkan lendir pada saat uji KOH 3% dan pada uji

pewarnaan Gram memunculkan warna merah. Tiga bakteri tersebut memiliki sel berbentuk batang, bersifat fermentatif, dan koloni berwarna putih pada media YDC. Menurut Schaad *et al.*, (2001) bakteri dengan karakteristik tersebut termasuk kedalam genus *Erwinia*.

Bakteri dengan genus *Erwinia* selain memiliki sifat patogen, namun terdapat bakteri yang bersifat non patogen. Menurut Procopio *et al.*, (2009) bakteri *Erwinia* sp. dapat bersifat antagonis terhadap mikroorganisme pada tanaman *Eucalyptus* spp. dengan melakukan persaingan ruang dan nutrisi.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Isolat bakteri hasil eksplorasi dari limbah cair tahu didapatkan sebanyak 60 isolat bakteri. Terdapat 33 isolat bakteri bersifat antagonis terhadap *X. a. pv. glycines*.
2. Berdasarkan hasil seleksi, dari 33 isolat bakteri yang bersifat antagonis dipilih 6 isolat bakteri yang terbaik. Berdasarkan zona hambat yang tertinggi, yaitu isolat dengan kode A1, A2, A15, C8, D7, dan D9. Dari hasil uji antagonis keenam isolat bakteri terpilih terhadap bakteri *X. a. pv. glycines*, isolat bakteri yang memiliki diameter zona hambat terbesar yaitu isolat C8, D7, dan D9.
3. Hasil identifikasi dan karakterisasi bakteri antagonis terhadap *X. a. pv. glycines* menunjukkan 3 isolat bakteri antagonis dengan kode A1, D7, dan D9 termasuk ke dalam genus *Pantoea*, 2 isolat bakteri antagonis dengan kode A2 dan A15 termasuk ke dalam genus *Clostridium*, dan 1 isolat bakteri antagonis dengan kode C8 termasuk ke dalam genus *Erwinia*.

5.2 Saran

Penelitian ini merupakan penelitian dasar terkait dengan potensi bakteri antagonis pada limbah cair tahu terhadap bakteri *X. a. pv. glycines* sehingga perlu dilakukan uji lanjut dalam skala semi lapang terhadap isolat terpilih. Selain itu, juga perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut hingga tingkat spesies terhadap bakteri antagonis terpilih.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Academic press. San Diego.
- Amaniyah, F. 2015. Eksplorasi Bakteri Endofit Potensial Antagonis dari Gulma Putri Malu (*Mimosa pudica* L.) Untuk Mengendalikan Penyakit Pustul (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) pada Kedelai. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ariyanti, E.L., dan A.S. Kumalasari. 2016. Karakterisasi Bakteri Antagonis dari Rizosfer Tanaman Kentang Sistem Aeroponik yang Berpotensi Sebagai Pengendali Penyakit Layu (*R. solanacearum*). Jurnal Ilmiah Agrotech 1(1) : 18-31
- Badan Pusat Statistik. 2017. Data Badan Pusat Statistik Tentang Produksi Kedelai (Online). <https://www.bps.go.id/linkTabledinamis/view/id/871> (Diakses pada 13 Desember 2018)
- Brooks, G. F., E. Jawetz, J.L.Melnick, and E.A. Adelberg. 2010. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology 25th ed. McGraw Hill Medical. New York.
- Campbell, J.P. 1989. The Search of Biological Control Agens Against Plant Pathogens : A Pragmatic Approach, Biological Agriculture and Holticulture. 3:317-327
- Cook, J.R and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathol. Soc. St. Paul.
- Diniyah, S. 2010. Potensi Isolat Bakteri Endofit sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) dan Jamur (*Fusarium* sp. dan *Phytophthora infestans*) Penyebab Penyakit Layu pada Tanaman. Skripsi. Universitas Islam Negeri Malang (UIN). Malang.
- Dunleavy, J M., D.W. Chamberlain, and J.P. Ross. 1966. Soybean Diseases. Agricultural Handbook. Washington.
- Ernawati dan K. Sari. 2011. Kandungan Senyawa Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea Americana* P.Mill) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. Jurnal Kajian Veteriner 3 (3): 203-211
- Fahy, P and G.J. Persley. 1983. Plant Bacteria Disease : A Diagnostic Guide. Academic Press. Sydney.
- Habazar, T., Z. Resti, Y. Yanti, J. Trisno, dan A. Diana. 2012. Penapisan Bakteri Endofit Akar Kedelai Secara n Planta untuk Mengendalikan Penyakit Pustul Bakteri. Jurnal Fitopatologi Indonesia 8(4): 103-109
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Gramedia. Jakarta.

- Herlambang, A. 2002. Teknologi Pengolahan Limbah Cair Industri Tahu. Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Lingkungan (BPPT) dan Badan Pengendalian Dampak Lingkungan Samarinda.
- Hidayat, N., M.C. Padaga, dan S. Suhartini. 2006. Mikrobiologi Industri. Andi Press. Yogyakarta.
- Iqlima, D., P. Ardiningsih, dan M.A. Wibowo. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit B2D dari Batang Tanaman Yakon (*Smalanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*. JKK 7(1): 36-43
- Irwansyah, A. 2018. Pengaruh Bakteri *Pseudomonas fluorecens* dan *Paenibacillus polymixa* Terhadap Intensitas Penyakit Hawar Upih Daun Seta Perumbuhan Tanaman Jagung Hibrida P27. Skripsi. Universitas Lampung. Lampung.
- Janse, J.D. 2005. Phytobacteriology: Principles an Practices. CABI Publishing. Wallingford. USA.
- Kasno, A.K., M. Dahlan, dan K. Hendroatmodjo. 1992. Tanggapan Genotipe Kedelai terhadap Penyakit Pustul. Hasil Penelitian Tanaman Pangan Tahun 1991. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Malang.
- Kaswinarni, F. 2007. Kajian Teknis Pengolahan Limbah Padat dan Cair Industri Tahu. Thesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kawaguchi, A., K. Inoue, dan Y. Ichinose. 2008. Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, Tomato by Non Pathogenic *Agrobacterium vitis* Strain VAR03-1. Journal Phytopatology. 98(11)
- Kementerian Pertanian. 2014. Outlook Komoditas Pertanian Tanaman Pangan Kedelai. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. Jakarta.
- Khaeruni, A., A. Suwanto, T. Budi, dan M.S. Sinaga. 2007. Deteksi Cepat Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai Menggunakan Teknik PCR dengan Primer Spesifik. Jurnal Biosciences. 14(2): 76-80
- Khaeruni, A., T. Budi, A. Suwanto, dan M.S. Sinaga. 2008. Virulensi Sejumlah Isolat *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Asal Edamame pada Tiga Varietas Kedelai. Jurnal HPT Tropika. 8(1): 39 – 46
- Kusmiyati dan N. W. S. Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyidium cruentum*. Jurnal Biodiversitas 8(1) : 48-53
- Kusuma, R R., S. Mahfudhoh, dan L.Q. Aini. 2016. Aplikasi Teh Kompos Untuk Menekan Penyakit Pustul Bakteri pada Tanaman Kedelai. Jurnal HPT 4(3)
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Rajawali Pers. Jakarta.

- Lestari, P.B. 2011. Biodegradasi Limbah Cair Tahu Dari Mikroorganismen Indigen Sebagai Bahan Ajar Mikrobiologi Lingkungan di Perguruan Tinggi. Tesis. Pendidikan Biologi IKIP Budi Utomo. Malang
- Lestari, W. 2013. Isolasi dan Uji Antifungi Ekstrak Metanol, Etil Asetat dan Heksana Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Mentigi (*Vaccinium varingaefolium*). Tesis. Univ. Sumatera Utara. Medan.
- Luthfiyyah, K. 2016. Eksplorasi Bakteri Antagonis Di Tanah Kawasan Organik Kebun Percobaan Cagar Sebagai Pengendali Bakteri Patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Skripsi. Univ. Brawijaya. Malang.
- Machmud, M., H. Jumanto, dan M. Sudjadi. 1999. Current progress of research on soybean diseases in Indonesia. Workshop on Soybean Biotechnology for Aluminium Tolerance on Acid Soil and Disease Resistance. Held at Ressearch Institut for Food Crops Biotechnology. Bogor. pp: 14-15
- Megasari, R., D. Biyatmoko, W. Ilham, dan J. Hadie. 2012. Identifikasi Keragaman Jenis Bakteri pada Proses Pengolahan Limbah Cair Industri Minuman dengan Lumpur Aktif Limbah Tahu. Jurnal Enviro Scientisteae 8 : 89-101
- Megasari, A. 2015. Uji Antagonis *Corynebacterium* sp. dan *Bacillus* sp. Untuk Mengendalikan Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Penyebab Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Noer, I. S dan Nurhayati. L. 2006 Bioaktivitas *Ulva reticulata* Forsskal. Asal Gili Kondo Lombok Timur Terhadap Bakteri. Jurnal Biotika 5 (1): 45-60
- Nohong. 2010. Pemanfaatan Limbah Tahu Sebagai Bahan Penyerap Logam Krom, Kadmiun dan Besi Dalam Air Lindi TPA. Jurnal Pembelajaran Sains. 6 (2)
- Nunez, I.R., L. Borrajo, L.G. Varela, G.L. Castro. 2002. Efficacy of Chlorhexidine Mouthrinses with and without Alcohol, J Periodontal, 73(3): 317-321
- Nurhayati. 2011. Penggunaan Jamur dan Bakteri dalam Pengendalian Penyakit Tanaman Secara Hayati yang Ramah Lingkungan . *Dalam* Kumpulan Makalah Bidang Ilmu-Ilmu Pertanian. BKS-PTN Wilayah Barat. Palembang.
- Nurhidayati S., Faturrahman, G. Mursal. 2015. Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. Jurnal Sains Teknologi dan Lingkungan 1(2) : 24-30
- Ozaktan, H and T. Bora. 2004. Biological Control of Fire Blight in Pear Orchards with a Formulation of *Pantoea agglomerans* Strain Eh 24. J. Microbiol 35(3)
- Panorama, C. 2005. Pemanfaatan Radiasi Sinar Gamma (CO-60) untuk Peningkatan Pertumbuhan dan Ketahanan Kedelai terhadap Penyakit Pustul Daun. Skripsi. Universitas Jember. Jember.

- Pelczar, M.J dan E.C.S. Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jilid 1. UI Press. Jakarta.
- Procopio, R.E.L., W.L. Araujo, W. Maccheroni, J.L. Azzefedo. 2009. Characteristic of an Endophytic Bacterial Community Associated with *Eucalyptus* spp. *Journal Genetics and Molecular Research* 8 (4): 1408-1422
- Pusey, P. L. 2002. Biological Control Agents for Fire Blight of Apple Compared Under Conditions Limiting Natural Dispersal. *Journal Plant Dis.* 86:639-644.
- Rahayu, M. 2005. Tanggapan Varietas Kedelai terhadap Penyakit Pustul *Xanthomonas axonopodis* dan Potensi Ekstrak Nabati untuk Pengendaliannya. Dalam Kumpulan Makalah. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Malang
- Retnowati, A. 2013. Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Ekstrak Etanol Kulit Kayu Akway (*Drymis piperita* Hool. f.) Terhadap *Staphylococcus saprophyticus* dan *Shigella sonnei*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Rezki. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Rizosfer Tanaman Pisang (*Musa paradisiaca*) Antagonis *Fusarium oxysporum* f.sp *musaceae* secara *In vitro*. Skripsi. Univ. Negeri Makassar. Makassar.
- Rijayanti, R. P. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera indica* L) Terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungura. Pontianak
- Rukayadi, Y., A. Suwanto, T. Budi, R. Harling. 1999. Survival and epiphytic fitness of a nonpathogenic mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Appl Environ Microbiol* 66:1183-1189
- Rusmana, A.A. 2005. Kloning Gen yang Terlibat dalam Mekanisme Patogenesis *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Tesis. Institut pertanian Bogor. Bogor.
- Ryder, M.H., P.M. Stephens, G.D. Bowen. 1994. Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Proc. Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Australia.
- Sadler, G.S. 2005. Bacteria Wilt Disease and The *Ralstonia solanacearum* Species Complex. The America Phytophatology Society. USA.
- Saleh, N dan S. Hardaningsih. 2013. Pengendalian Penyakit Terpadu pada Tanaman Kedelai. Prosiding Seminar Nasional. Balai Penelitian Tanaman Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian. Malang
- Salerno, C.M., and M.A. Sagordy. 2003. Short Communication : Antagonistic Activity by *Bacillus subtilis* Against *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* Under Controlled Conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2): 55-58

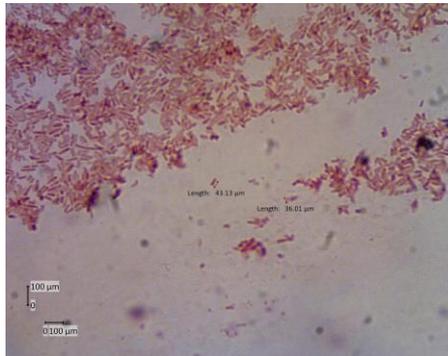
- Schaad, N.W., Jones. J.B, Chun. W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Second edition. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Sigee. 1993. Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects. Cambridge University Pr. Melbourne.
- Semangun, H. 1991. Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Simbolon, J.F. 2017. Pemanfaatan Bakteri Antagonis Limbah Cair Tahu sebagai Pengendalian Penyakit Rebah Semai (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) pada Tanaman Kedelai. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sugiharto, 1994. Dasar-Dasar Pengolahan Air Limbah. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Suskandini, R, dan R. Eviyanti. 2007. Pestisida Organik Berbahan Aktif Bakteri Agensia Hayati yang Efektif Mengendalikan Pustul Bakteri pada Kedelai. J. Agrijati 6 (1) : 37-42.
- Violatti, M and D.T. Nilvanira. 2016. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in Soybean Seeds. J. Summa Phytopathol 42(3)
- Waluyo, L. 2008. Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Widiantini, F., Y. Endah, N. Ceppy. 2018. Potensi Antagonisme Senyawa Metabolit Sekunder Asal Bakteri Endofit dengan Pelarut Metanol Terhadap Jamur *G. boninense* Pat. Jurnal Agrikultura 29(1): 55-60
- Wright,S.P., J.W. Yavitt, N. Wurzburger, B.B. Turner, E.V.J. Tanner, E.J. Sayer, and L.S. Santiago. 2011. Potassium, phosphorus or nitrogen limit root allocation, tree growth, or litter production in a lowland tropical forest. Ecology. 92(8): 1616-1625.
- Wuryandari, Y., A. Purnawati, T. Arwiyanto, dan B. Hadisutrisno. 2008. Kemampuan Antagonistik Beberapa Isolat *Pseudomonas fluorescens* terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu pada tanaman tomat. Jurnal Pengendalian Hayati 1(1): 1-5.
- Yanti, Y., T. Habazar, Z. Resti, dan D. Suhailita. 2013. Penapisan Isolat Rizobakteri dari Perakaran Tanaman Kedelai yang Sehat untuk Pengendalian Penyakit Pustul Bakteri (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). Jurnal HPT Tropika 13 (1)
- Yanti, Y., T. Habazar, Z. Resti. 2017. Fomulasi Padat Rhizobakteria Indigenus *Bacillus thuringiensis* TS2 dan Waktu Penyimpanan untuk Mengendalikan Penyakit Pustul Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Jurnal HPT Tropika 17 (1): 1-9
- Yudhistira, B., M. Andriani, dan R. Utami. 2016. Karakteristik Limbah Cair Tahu dengan Koagulan yang Berbeda (Asam Asetat dan Kalsium Sulfat). Journal of Sustainable Agriculture 31(2): 137-145

Yustianita, E. 2015. Karakterisasi dan Uji Bakteri Endofit untuk Pengendalian *Ralstonia solanacearum* Patogen Penyebab Penyakit Layu pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Skripsi. Univ. Brawijaya. Malang.

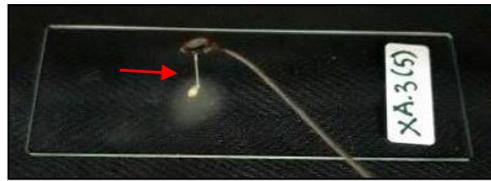


LAMPIRAN

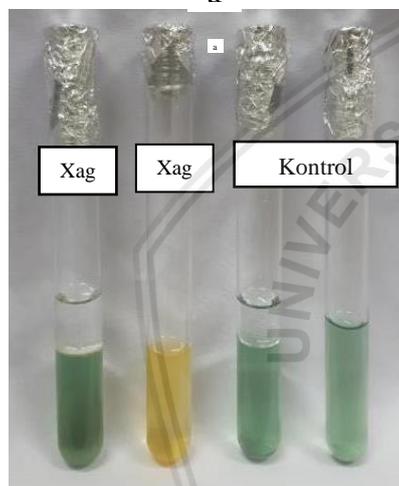
Lampiran 1. Dokumentasi hasil identifikasi bakteri patogen



a



b



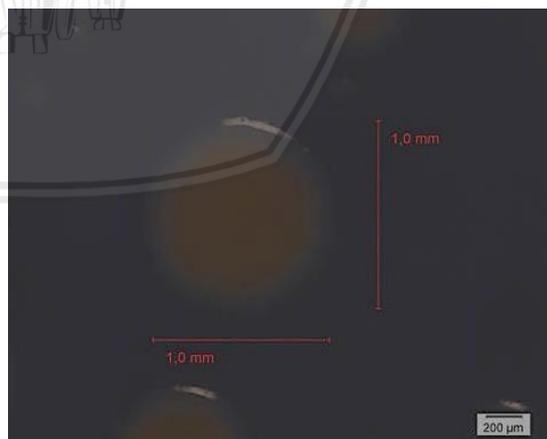
c



d



e



f

(a) hasil pewarnaan Gram; (b) hasil uji KOH 3%; (c) hasil uji OF; (d) hasil uji YDC ; (e) hasil uji YDC 33°C; (f) hasil pengamatan koloni tunggal bakteri

Lampiran 2. Tabel analisis ragam rerata diameter uji antagonis bakteri limbah cair tahu terhadap *X. a. pv. glycines* pada 24, 48, dan 72 jam setelah inokulasi

a. Hasil analisis uji ragam pada 24 JSI

SK	JK	db	KT	F hitung	P	F tabel 5%
Perlakuan	28,33	7	4,05	11,37	0,0000028	2,42
Galat	8,54	24	0,36			
Total	36,87	31				

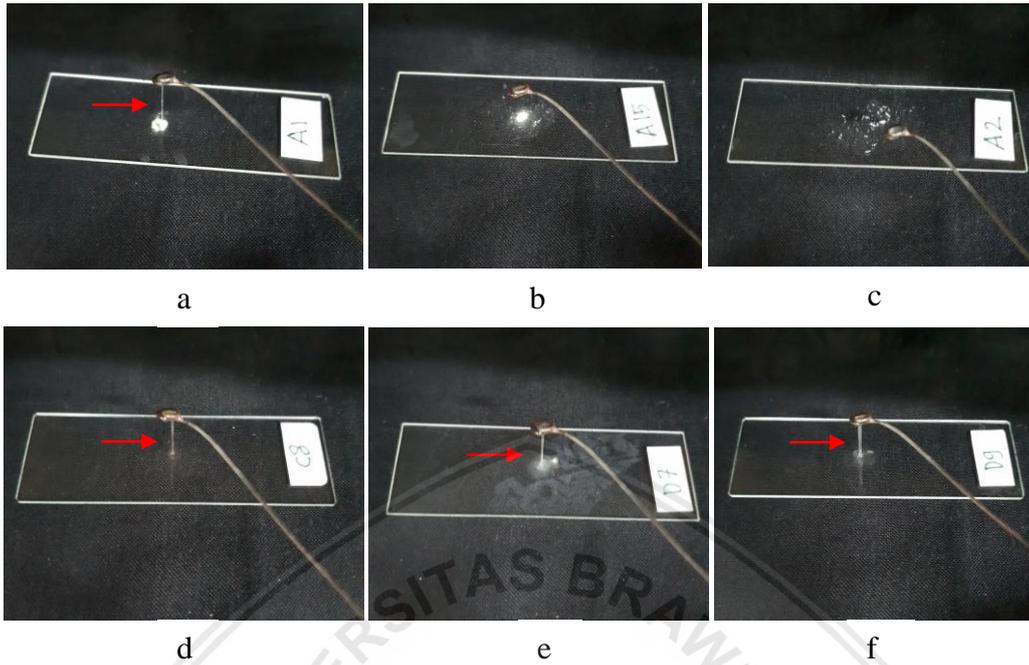
b. Hasil analisis uji ragam pada 48 JSI

SK	JK	db	KT	F hitung	P	F tabel 5%
Perlakuan	28,78	7	4,11	13,96	0,00000044	2,42
Galat	7,07	24	0,29			
Total	35,86	31				

c. Hasil analisis uji ragam pada 72 JSI

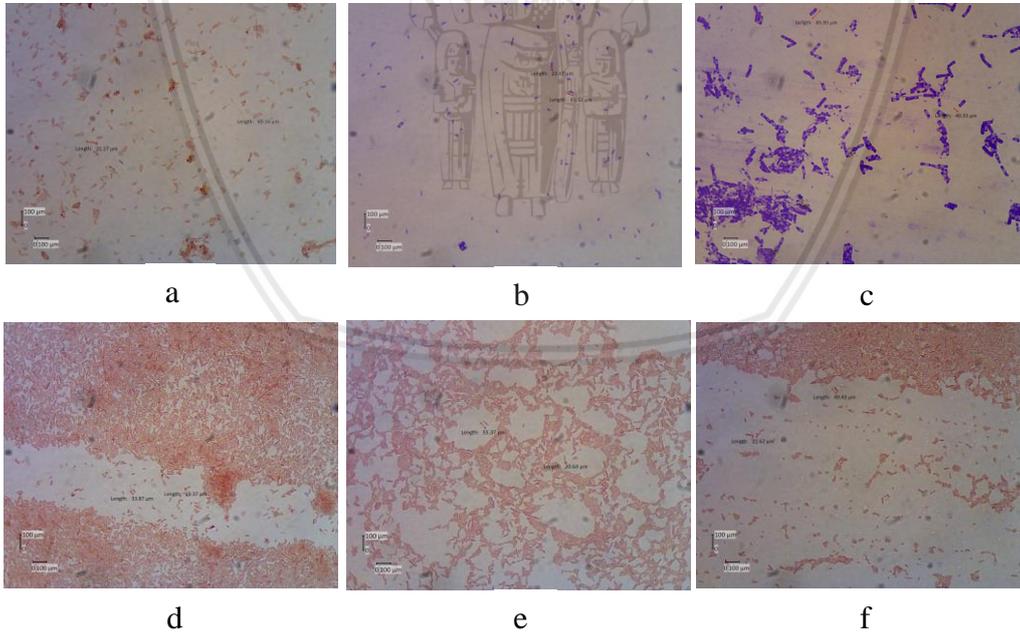
SK	JK	db	KT	F hitung	P	F tabel 5%
Perlakuan	26,93	7	3,85	13,22	0,00000072	2,42
Galat	6,98	24	0,29			
Total	33,91	31				

Lampiran 3. Dokumentasi hasil uji KOH 3% bakteri antagonis



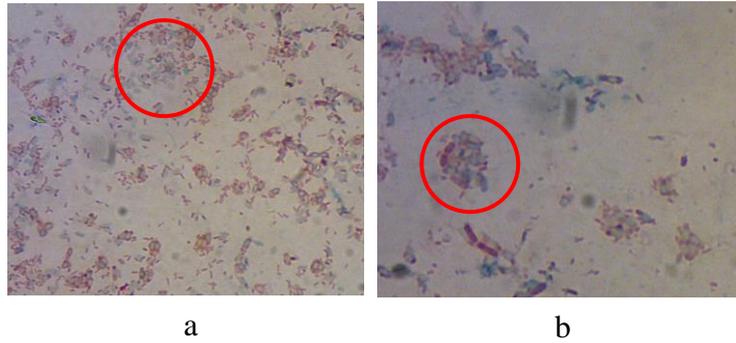
(a) isolat A1; (b) isolat A2; (c) isolat A15; (d) isolat C8; (e) isolat D7; (f) isolat D9

Lampiran 4. Dokumentasi hasil uji pewarnaan Gram bakteri antagonis



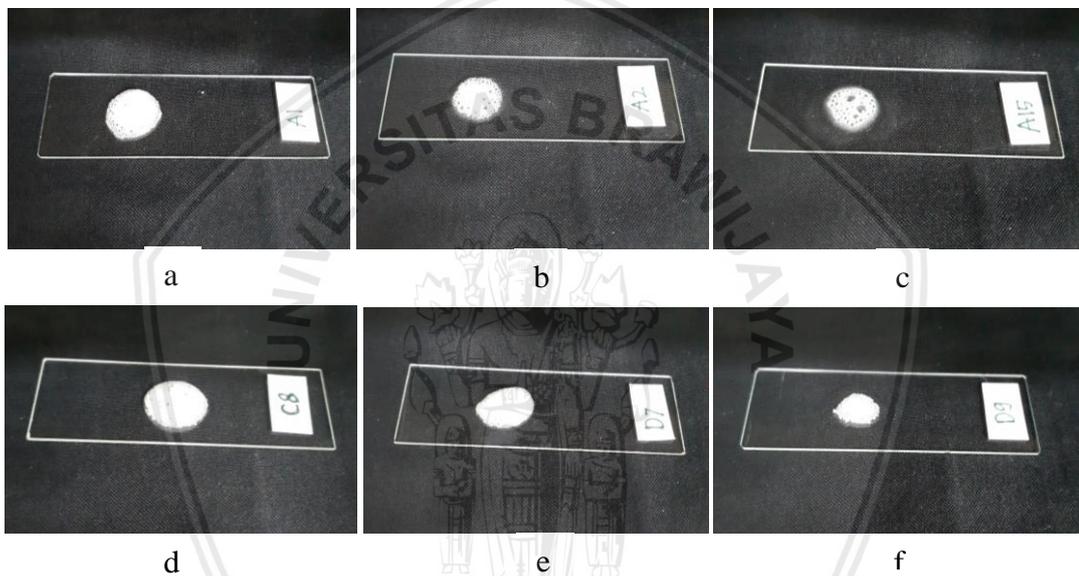
(a) isolat A1; (b) isolat A2; (c) isolat A15; (d) isolat C8; (e) isolat D7; (f) isolat D9

Lampiran 5. Dokumentasi hasil uji pewarnaan spora bakteri antagonis



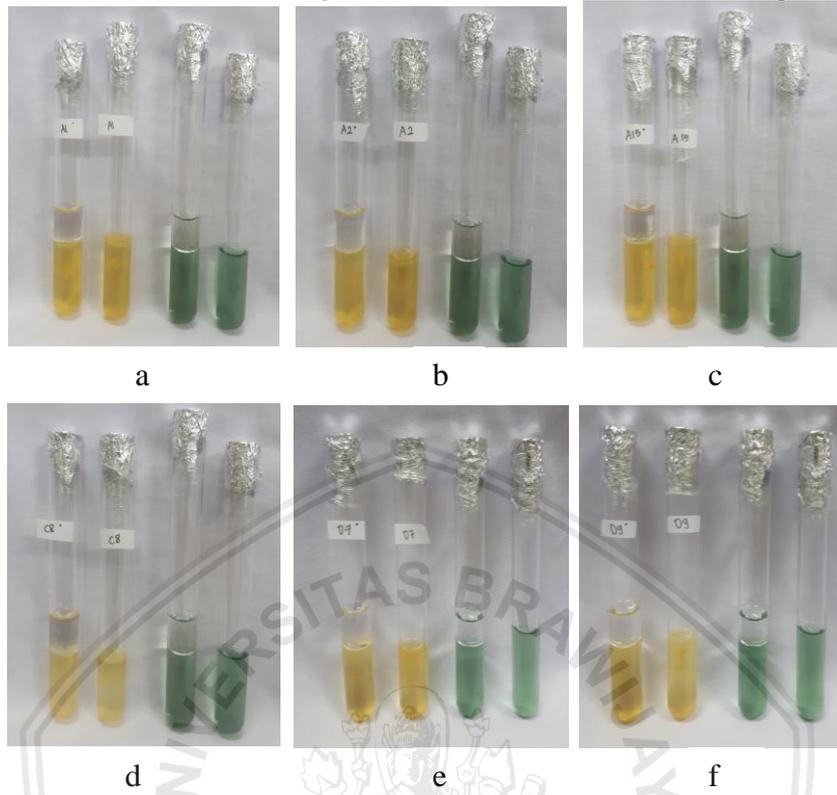
(a) isolat A2; (b) isolat A15

Lampiran 6. Dokumentasi hasil uji KOH 3% bakteri antagonis



(a) isolat A1; (b) isolat A2; (c) isolat A15; (d) isolat C8; (e) isolat D7; (f) isolat D9

Lampiran 7. Dokumentasi hasil uji oksidatif-fermentatif bakteri antagonis



(a) isolat A1; (b) isolat A2; (c) isolat A15; (d) isolat C8; (e) isolat D7; (f) isolat D9

Lampiran 8. Dokumentasi hasil uji YDC bakteri antagonis



a

b

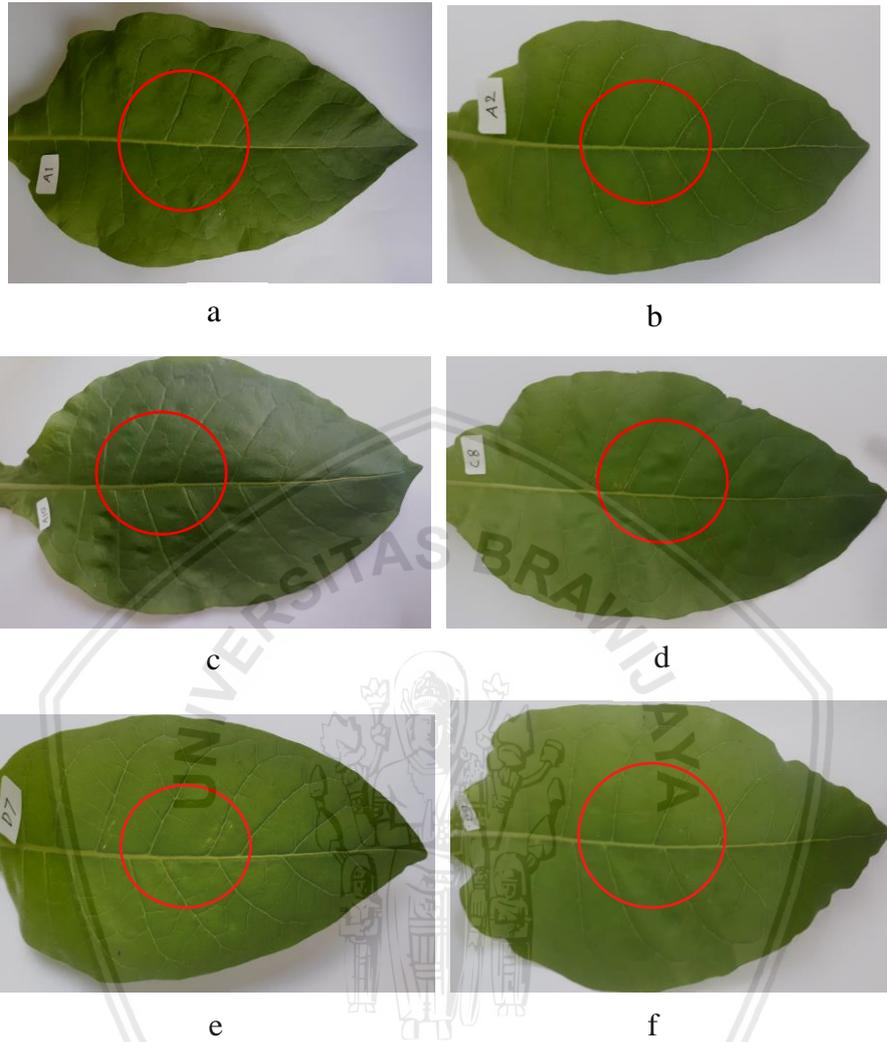
c



d

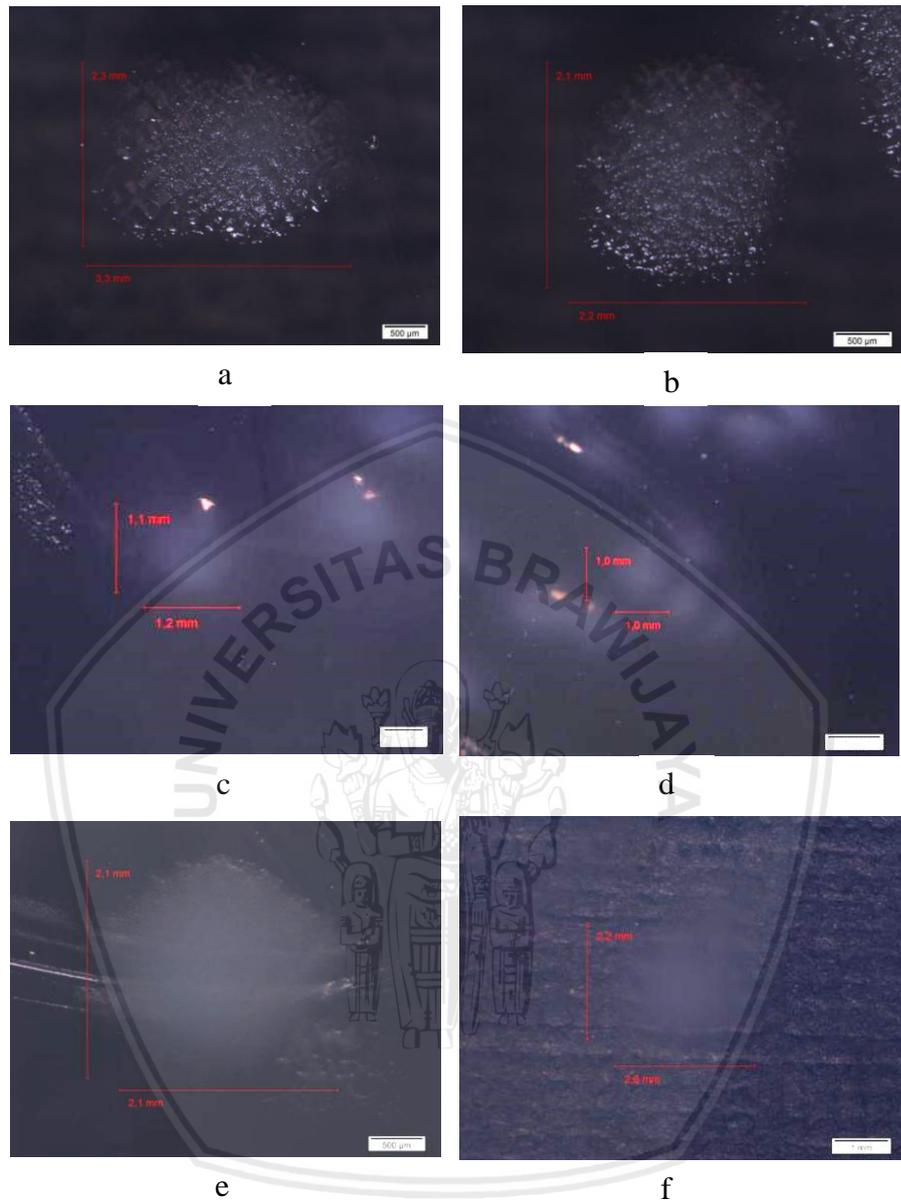
(a) isolat A1; (b) isolat C8; (c) isolat D7; (d) isolat D9

Lampiran 9. Dokumentasi hasil uji hipersensitif bakteri antagonis



(a) isolat A1; (b) isolat A2; (c) isolat A15; (d) isolat C8; (e) isolat D7; (f) isolat D9

Lampiran 10. Dokumentasi hasil morfologi koloni bakteri antagonis



(a) isolat A1; (b) isolat A2; (c) isolat A15; (d) isolat C8; (e) isolat D7; (f) isolat D9