

**EKSPLORASI BAKTERI *INDIGENOUS* ENDOFIT
TANAMAN KUBIS (*Brassica oleraceae*) ORGANIK UNTUK
MENGENDALIKAN PENYAKIT BUSUK HITAM**

Oleh

VERISCA AGIL WINANDA SANTOSO



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG**

2020



**EKSPLORASI BAKTERI *INDIGENOUS* ENDOFIT TANAMAN
KUBIS (*Brassica oleraceae*) ORGANIK UNTUK
MENGENDALIKAN PENYAKIT BUSUK HITAM**

Oleh

VERISCA AGIL WINANDA SANTOSO

165040201111012

PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI

MINAT PERLINDUNGAN TANAMAN

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh

Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

MALANG

2020

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan yang terdapat didalam skripsi saya merupakan ide pemikiran atau hasil dari penelitian yang saya lakukan sendiri dengan bimbingan dari dosen pembimbing. Skripsi dengan topik yang saya ambil tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar sarjana dari perguruan tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya tulisan atau pendapat yang sama yang pernah ditulis maupun diterbitkan oleh orang lain, kecuali telah dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam daftar pustaka.

Malang, 7 Desember 2020

Verisca Agil Winanda Santoso

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Penelitian : Eksplorasi Bakteri *Indigenous* Endofit Tanaman Kubis (*Brassica oleraceae*) Organik Untuk Mengendalikan Penyakit Busuk Hitam

Nama Mahasiswa : Verisca Agil Winanda Santoso

NIM : 165040201111012

Jurusan : Hama dan Penyakit Tumbuhan

Program Studi : Agroekoteknologi

Disetujui

Pembimbing Utama,

Luqman Ourata Aini, SP., M.Si., PhD.
NIP. 19720919 199802 1 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan

Luqman Ourata Aini, SP., M.Si., PhD.
NIP. 19720919 199802 1 001

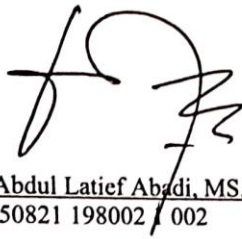
Tanggal persetujuan: 22 FEB 2021



LEMBAR PENGESAHAN


Mengesahkan,
MAJELIS PENGUJI

Penguji I,




Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS.
NIP. 19550821 198002 1002

Penguji II,



Dr. Agr. Sc. Hagus Tarno, S.P., M.P.
NIP. 19770810 200212 1003

Penguji III



Luqman Qurata Aini, S.P., M.Si., Ph.D.
NIP. 19720919 199802 1001

Tanggal Lulus : 29 DEC 2020



*Skripsi ini aku persembahkan untuk kedua orangtua dan adik tercinta
yang selalu memberi dukungan dan selalu menjagaku dalam doanya
serta sahabat dan semua orang yang menyayangiku,
Terimakasih untuk support dan doa baiknya selama ini ...*



RINGKASAN

VERISCA AGIL WINANDA SANTOSO. 165040201111012. Eksplorasi Bakteri *Indigenous* Endofit Tanaman Kubis (*Brassica oleraceae*) Organik untuk Mengendalikan Penyakit Busuk Hitam. Dibawah bimbingan Luqman QurataAini, SP., M.Si., PhD.

Tanaman kubis merupakan tanaman sayuran yang banyak dikonsumsi masyarakat di Indonesia karena memiliki kandungan gizi yang tinggi. Kubis juga merupakan salah satu komoditas hortikultura penting dan penyumbang devisa tertinggi ketiga dari sayuran semusim di Indonesia. Namun produksi kubis terus mengalami penurunan. Hal disebabkan oleh penyakit busuk hitam yang dapat menimbulkan kerusakan hingga 70%. Sejah ini pengendalian kimia dengan pestisida sintetis yang dapat merusak lingkungan, keamanan pangan produk pertanian, dan kesehatan manusia paling banyak dilakukan untuk mengendalikan penyakit busuk hitam. Oleh karena itu pengendalian ramah lingkungan perlu dikembangkan. Salah satunya dengan menggunakan agen antagonis berupa bakteri endofit. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi dan keragaman bakteri *indigenous* endofit kubis yang dapat dimanfaatkan sebagai pengendalian hayati patogen *X. campestris*.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2019 sampai Agustus 2020. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu: pengambilan sampel tanaman kubis organik, isolasi patogen tanaman *X. campestris*, Uji Patogenesitas, Eksplorasi dan seleksi bakteri endofit tanaman kubis, Uji antagonisme bakteri endofit, Karakterisasi bakteri endofit. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang diuji meliputi kontrol positif *streptomycin* dan 5 isolat bakteri terpilih dari hasil seleksi antagonis. Selanjutnya, data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam dan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf signifikansi 5% pada software SPSS.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa patogen hasil isolasi sesuai dengan karakteristik bakteri patogen *X. campestris*. Isolasi bakteri endofit pada daun kubis diperoleh 119 isolat dengan karakteristik koloni yang berbeda. Berdasarkan hasil seleksi diperoleh 13 isolat dapat menghasilkan zona hambat. Kemudian 5 isolat terpilih dilakukan uji antagonis dengan bakteri patogen. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri antagonis berpengaruh nyata dalam menghambat *X. campestris* dibandingkan dengan kontrol *streptomycin*. Bakteri antagonis isolat E33 merupakan bakteri genus *Corynebacterium* sp., isolat E79 merupakan bakteri genus *Erwinia* sp., dan isolat E95, E102, E109 merupakan bakteri genus *Pseudomonas* sp. Isolat bakteri genus *Pseudomonas* sp. memiliki daya hambat terbaik dibandingkan dengan isolat lainnya.

SUMMARY

VERISCA AGIL WINANDA SANTOSO. 165040201111012. Eksplorasi Bakteri *Indigenous* Endofit Tanaman Kubis (*Brassica oleraceae*) Organik untuk Mengendalikan Penyakit Busuk Hitam. Dibawah bimbingan Luqman QurataAini, SP., M.Si., PhD.

Cabbage is a vegetable crop that is widely consumed by people in Indonesia because it has a high nutritional content. Cabbage is also one of the important horticultural commodities and the third highest foreign exchange earner from seasonal vegetables in Indonesia. However, cabbage production continues to decline. This is caused by black rot which can cause damage up to 70%. So far, chemical control with synthetic pesticides that can damage the environment, food safety for agricultural products, and human health is mostly done to control black rot. Therefore, environmentally friendly controls need to be developed. One of them is by using an antagonistic agent in the form of endophytic bacteria. This research was conducted to determine the potential and diversity of *indigenous* endophytic bacteria of cabbage which can be used as biological control for pathogenic *X. campestris*.

The research was conducted at the Plant Disease Laboratory, Department of Pests and Plant Diseases, Faculty of Agriculture, Brawijaya University from December 2019 to August 2020. This research consisted of several stages, namely: taking organic cabbage plant samples, isolating plant pathogens *X. campestris*, Pathogenicity Test, Exploration and selection endophytic bacteria of cabbage plant, test for antagonism of endophytic bacteria, characterization of endophytic bacteria. The research design used was a completely randomized design (CRD) with 6 treatments and 4 replications. The treatments tested included positive control for *streptomycin* and 5 selected bacterial isolates from the antagonist selection results. Furthermore, the data from the observations were analyzed using variance and further tests using the Duncan Multiple Range Test (DMRT) with a significance level of 5% in the SPSS software.

The results of the observations indicated that the pathogen isolated in accordance with the characteristics of the *X. campestris* pathogen. The isolation of endophytic bacteria on cabbage leaves obtained 119 isolates with different colony characteristics. Based on the selection results, 13 isolates can produce inhibition zones. Then the 5 selected isolates were tested for antagonism with pathogenic bacteria. The results of the analysis of variance showed that the five antagonistic bacterial isolates had a significant effect in inhibiting *X. campestris* compared to the control *streptomycin*. The antagonistic bacteria isolate E33 is a bacterium of the genus *Corynebacterium* sp., Isolate E79 is a bacterium of the genus *Erwinia* sp., and isolates E95, E102, E109 are bacteria of the genus *Pseudomonas* sp. Isolate of the genus *Pseudomonas* sp. has the best inhibition compared to other isolates.



KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Eksplorasi Bakteri *Indigenus* Endofit Tanaman Kubis (*Brassica oleraceae*) Organik Untuk Mengendalikan Penyakit Busuk Hitam”. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk menyelesaikan program sarjana S-1.

Pada kesempatan kali ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., PhD. selaku dosen pembimbing dan ketua jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan arahan, nasehat, dan bimbingan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Penghargaan dan terimakasih yang tulus penulis ucapkan kepada kedua orang tua dan sahabat atas doa, cinta, ridho dan segala dukungannya yang senantiasa mengiringi langkah penulis.

Penulis berharap semoga proposal skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis, dan pembaca yang membutuhkan informasi mengenai tulisan ini.

Malang, November 2020

Penulis

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Verisca Agil Winanda Santoso dilahirkan di Kota Batu pada tanggal 14 September 1998 sebagai putri pertama dari Bapak Budi Santoso dan Ibu Indayani. Penulis menempuh pendidikan dasar di SDN Sumbergondo 02 pada tahun 2004-2010, kemudian penulis melanjutkan ke SMP Negeri 01 Batu pada tahun 2010 dan lulus pada tahun 2013. Pada tahun 2013 penulis melanjutkan sekolah menengah atas di SMA Negeri 01 Batu. Tahun 2016 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Strata-1 Program Studi Agroekoteknologi melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) dan pada tahun 2018 penulis mengambil Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan dengan pilihan laboratorium pada Laboratorium Bakteri sebagai Patogen Tanaman.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti kepanitiaan dan berorganisasi. Penulis aktif dalam Himpunan Mahasiswa Perlindungan Tanaman (HIMAPTA) 2019 sebagai Staff Departemen Administrasi dan Kesekretariatan. Selain itu penulis pernah mengikuti kepanitiaan Pemilihan Wakil Mahasiswa (PEMILWA FP) 2017 sebagai divisi humas, Rangkaian Orientasi Program Studi Agroekoteknologi (RANTAI 8) 2017 sebagai sekretaris pelaksana, Klinik Tanaman 2019 sebagai divisi acara, *Upgrading* Himapta 2019 sebagai divisi perlengkapan, Buka Bersama dan Halal Bihalal HIMAPTA sebagai divisi perlengkapan, Pendidikan Dasar dan Orientasi Terpadu Keprofesian (PROTEKSI) 2019 sebagai divisi konsumsi, *Plant Protection Competition* (PPC) 2019 sebagai koordinator divisi dana usaha & konsumsi, Anniversary of Himapta Djaya (ARTHROPODA) 2019 sebagai divisi konsumsi.

Penulis pernah menjadi Asisten Praktikum mata kuliah Dasar Ilmu Tanah tahun 2017 dan 2018, Asisten Praktikum mata kuliah Hama dan Penyakit Penting Tanaman tahun 2019. Selain itu, penulis juga pernah memperoleh Juara 1 *Linnean Games* yang diselenggarakan Perhimpunan Entomologi Indonesia (PEI) pada tahun 2019. Penulis juga lolos pendanaan Program Mahasiswa Wirausaha (PMW) Fakultas Pertanian tahun 2017, dan lolos pendanaan Program Kreatifitas Mahasiswa (PKM) tahun 2020.

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----------|
| RINGKASAN..... | i |
| SUMMARY..... | ii |
| KATA PENGANTAR..... | iii |
| DAFTAR RIWAYAT HIDUP..... | iv |
| DAFTAR ISI..... | v |
| DAFTAR TABEL..... | vii |
| DAFTAR GAMBAR..... | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | ix |
| I. PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 1.4 Hipotesis Penelitian..... | 3 |
| 1.5 Manfaat Penelitian..... | 3 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| 2.1 Tanaman Kubis..... | 4 |
| 2.2 Pertanian Organik..... | 5 |
| 2.3 Patogen <i>Xanthomonas campestris</i> penyebab penyakit busuk hitam..... | 5 |
| 2.4 Bakteri <i>Indigenous</i> Endofit pada Tanaman Kubis..... | 6 |
| 2.5 Mekanisme bakteri antagonis dalam menekan bakteri <i>X. campestris</i> | 7 |
| III. METODE PENELITIAN..... | 9 |
| 3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian..... | 9 |
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 9 |
| 3.3 Metode Penelitian..... | 9 |
| 3.4 Pelaksanaan Penelitian..... | 9 |
| 3.5 Variabel Pengamatan..... | 15 |
| 3.6 Analisis Data..... | 15 |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 17 |
| 4.1 Hasil Isolasi Bakteri Patogen <i>X. campestris</i> pada kubis..... | 17 |
| 4.2 Hasil Uji Patogenitas pada Tanaman Kubis..... | 20 |
| 4.3 Hasil Seleksi Bakteri Antagonis Terhadap <i>X. campestris</i> | 21 |
| 4.4 Potensi Bakteri Antagonis terhadap Patogen <i>X. campestris</i> | 23 |
| 4.5 Karakterisasi Bakteri Endofit Kubis..... | 25 |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 35 |
| 5.1 Kesimpulan..... | 35 |
| 5.2 Saran..... | 35 |

DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

36
41



DAFTAR TABEL

| No. | Teks | Halaman |
|-----|---|---------|
| 1. | Zona Bening isolat bakteri endofit tanaman kubis dengan <i>X. campestris</i> setelah 24 jam inokulasi | 23 |
| 2. | Rerata Diameter Zona Hambat Bakteri Endofit Dalam Mengendalikan Patogen <i>X. campestris</i> | 23 |
| 3. | Karakteristik morfologi koloni tunggal bakteri..... | 25 |
| 4. | Karakterisasi fisiologi 5 genus bakteri antagonis..... | 27 |



DAFTAR GAMBAR

| No. | Teks | Halaman |
|-----|--|---------|
| 1. | Daun kubis terserang bakteri <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 6 |
| 2. | Bagan alir identifikasi bakteri hingga tingkat genus..... | 15 |
| 3. | Tanaman kubis bergejala terserang penyakit busuk hitam | 17 |
| 4. | Isolasi patogen <i>X. campestris</i> : (A) pertumbuhan pada media NA 24 jam; (B) hasil purifikasi isolat patogen..... | 17 |
| 5. | Uji hipersensitif pada daun tembakau 48 jam: (A) Reaksi positif pada daun tembakau menimbulkan gejala kekuningan dan nekrosis; (B) Reaksi negatif pada daun yang disuntik dengan aquades..... | 18 |
| 6. | Karakterisasi fisiologi isolat patogen: (A) Pengujian KOH; (B) Pewarnaan Gram; (C) Uji OF; (C) Uji pertumbuhan pada YDC..... | 19 |
| 7. | Uji patogenesitas pada tanaman kubis: (A) Gejala menguning pada tepi daun mulai muncul pada 8 HSI; (B) Gejala meluas menuju tengah daun dan terjadi nekrosis pada 19 HSI; (C) Tanaman kontrol..... | 20 |
| 8. | Hasil eksplorasi bakteri endofit: (A) pertumbuhan pada media NA 24 jam; (B) purifikasi bakteri hasil eksplorasi..... | 21 |
| 9. | Reaksi hipersensitif pada daun tembakau bakteri endofit hasil eksplorasi..... | 22 |
| 10. | Kenampakan zona hambat bakteri antagonis dengan patogen <i>X. campestris</i> , (A). Kontrol, (B). E33, (C). E79, (D). E95, (E). E102, (F). E109..... | 24 |
| 11. | Kenampakan morfologi koloni bakteri antagonis: (A) isolat E33; (B) isolat E79; (C) isolat E95; (D) isolat E102; (E) isola 109 | 26 |
| 12. | Warna dan bentuk sel pada pewarnaan Gram: (A) isolat E33; (B) isolat E102..... | 27 |
| 13. | Reaksi pengujian KOH 3%: (A) isolat E33 tidak berlendir; (B) isolat E95 berlendir..... | 28 |
| 14. | Isolat bakteri bereaksi positif mengasilkan gelembung pada uji katalase..... | 29 |
| 15. | Hasil pewarnaan spora | 29 |
| 16. | Hasil pengujian OF: (A) Isolat bakteri E109 bersifat oksidatif; (B) Isolat bakteri E79 bersifat fermentatif..... | 30 |
| 17. | Pigmen <i>fluorescens</i> pada isolat bakteri antagonis: (A) Isolat E33 tidak berpendar; (B) Isolat E109 berpendar | 31 |
| 18. | Hasil uji pertumbuhan pada YDC pada isolat E79 | 31 |

DAFTAR LAMPIRAN

| No. | Teks | Halaman |
|-----|------|---------|
|-----|------|---------|

- | | | |
|----|--|----|
| 1. | Lahan pengambilan sampel tanaman kubis di ATP Universitas Brawijaya | 41 |
| 2. | Analisis ragam rerata penghambatan bakteri endofit antagonis terhadap patogen <i>X. campestris</i> | 41 |
| 3. | Karakterisasi isolat bakteri endofit antagonis | 42 |



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kubis merupakan tanaman sayuran yang banyak dikonsumsi masyarakat di Indonesia karena memiliki kandungan gizi yang tinggi. Pada 100 g kubis mengandung protein 1,7 g; karbohidrat 5,3 g; kalsium 64 mg; serat 0,9 g; vitamin A 75 mg; vitamin C 62 mg; dan air 91-93% (Utama dan Mulyanto, 2009).

Kubis juga merupakan salah satu komoditas hortikultura penting dan penyumbang devisa tertinggi ketiga dari sayuran semusim dengan jumlah berat bersih 5,38 ribu ton atau setara 1,4 juta US \$ (BPS, 2018). Namun produksi kubis di Indonesia terus mengalami penurunan pada 2017, persentase penurunan produksi kubis mencapai 4,67% dan tahun 2018 menurun kembali sebesar 2,40% (BPS, 2018). Penurunan produksi kubis dapat terjadi karena serangan OPT baik hama maupun penyakit tanaman. Salah satu penyakit utama pada tanaman kubis adalah penyakit busuk hitam. Menurut Bila *et al.*, (2019), busuk hitam oleh *X. campestris* dapat menyebabkan kerusakan hingga mencapai 70%.

Bakteri *X. campestris* menyerang jaringan pengangkutan pada tanaman dan dapat menyebar pada sistem vaskular daun dan batang. Tanaman yang terserang *X. campestris* akan memunculkan gejala berupa hawar berbentuk V pada daun dan pada irisan melintang dari petiole (tangkai daun) menunjukkan jaringan xylem yang seperti tersumbat serta berwarna hitam. Pada serangan lebih lanjut dapat menyebabkan tanaman membusuk. Sehingga menurunkan kualitas dan nilai ekonomis tanaman. Penyebaran bakteri *X. campestris* melalui stomata dan luka pada daun (Pratama, 2015; Wati *et al.*, 2017).

Beberapa pengendalian yang dilakukan untuk mengendalikan penyakit busuk hitam antara lain pengendalian secara fisik, pengendalian secara mekanis, dan pengendalian secara kimia. Menurut riset yang telah dilakukan oleh Pratama (2017), pengendalian yang paling sering digunakan petani dalam mengendalikan penyakit busuk hitam adalah menggunakan pengendalian kimia dengan pestisida sintesis berbahan aktif propineb, klorpirofos, klorantraniliprol, profenofos, mankozeb, dan flusulfamide. Penggunaan bakterisida yang berlebihan akan berdampak negatif terhadap lingkungan, keamanan pangan produk pertanian, dan kesehatan manusia (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Hal tersebut dapat terjadi karena bahan kimia yang diaplikasikan tidak sepenuhnya mengenai OPT sasaran.

Menurut Mujib *et al.*, (2014) residu pestisida dapat terbawa air terbuang ke tanah sekitar 30% dan meningkat pada musim hujan hingga mencapai 80%. Oleh karena itu pengendalian penyakit tanaman yang ramah lingkungan perlu dikembangkan.

Salah satunya dengan menggunakan agen antagonis berupa bakteri endofit.

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup pada jaringan tanaman yang memiliki peran dalam memicu inang untuk memproduksi fitoaleksin, bertahan dalam kondisi stres, sekaligus sebagai agens pengendalian secara langsung (Yulianti, 2013). Bakteri endofit dapat diperoleh dari bagian atau jaringan tanaman. Kelompok bakteri endofit antara lain dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Burkholderia* yang dapat menghasilkan antibiotik, antitumor, antijamur, antivirus, senyawa volatil, bahkan insektisida (Lodewyckx *et al.*, 2002). Bakteri endofit *indigenous* dinilai mampu beradaptasi pada lingkungan dan lebih kompetitif dibandingkan dengan bakteri non *indigenous* (Yanti *et al.*, 2019). Bakteri endofit *indigenous* yang berpotensi dapat diperoleh dari tanaman sehat yang dibudidayakan secara organik. Penelitian (Xia *et al.*, 2015) menyatakan kelimpahan spesies bakteri endofit yang ditemukan pada beberapa tanaman hortikultura relatif konsisten lebih tinggi pada sistem pertanian organik (71%) daripada sistem konvensional (29%). Sedangkan bakteri yang ditemukan beragam, 32 spesies bakteri diisolasi dari tanaman organik, dan 28 spesies diisolasi dari tanaman konvensional.

Pengelolaan penyakit busuk hitam pada kubis pada pertanian organik harus dilakukan secara ramah lingkungan. Salah satu solusinya yaitu menggunakan bakteri endofit antagonis yang habitat atau relungnya sama dengan patogen *X. campestris* dan mampu berkembang serta beradaptasi pada tanaman kubis. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi dan keragaman bakteri *indigenous* endofit kubis yang dapat dimanfaatkan sebagai pengendalian hayati patogen *X. campestris*, sebagai penyebab penyakit busuk hitam pada tanaman kubis.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah terdapat bakteri endofit tanaman kubis organik yang bersifat antagonis terhadap patogen *X. campestris* penyebab busuk hitam pada kubis?
2. Bagaimana potensi bakteri endofit tanaman kubis organik dalam menghambat perkembangan patogen *X. campestris* penyebab busuk hitam pada kubis?
3. Bagaimana karakteristik bakteri endofit tanaman kubis organik dalam mengendalikan perkembangan patogen *X. campestris*?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya isolat bakteri endofit pada tanaman kubis organik yang berpotensi antagonis terhadap patogen *X. campestris*, dan mengkaji karakteristik bakteri endofit antagonis tersebut yang dapat digunakan dalam mengendalikan perkembangan patogen *X. campestris*.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini yaitu pada endofit tanaman kubis organik terdapat bakteri endofit antagonis yang berpotensi menghambat perkembangan patogen *X. campestris* penyebab penyakit busuk hitam pada kubis, dan bakteri endofit antagonis kubis organik memiliki karakteristik yang berbeda.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini dapat memberikan pengetahuan dan informasi kepada mahasiswa, masyarakat dan petani hortikultura khususnya petani tanaman kubis tentang keanekaragaman bakteri antagonis pada tanaman kubis serta potensi bakteri antagonis untuk menghambat patogen tanaman kubis dan juga dapat dijadikan acuan untuk penelitian dan pengendalian tahap selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kubis

Menurut Zulkarnain (2013) tanaman kubis merupakan tanaman yang dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Cruciferales
Famili : Cruciferae
Genus : Brassica
Spesies : *Brassica oleracea*

Tanaman kubis dapat tumbuh pada semua jenis tanah terutama paling cocok pada tanah lempung berpasir, lempung atau lempung berliat yang memiliki drainase cukup baik. Tanaman kubis termasuk tanaman yang toleran terhadap tanah masam dan basa dengan batas pH 5,5 hingga 6,5. Tanaman kubis merupakan tanaman yang dapat menghasilkan mutu produk yang baik bila dibudidayakan di daerah beriklim dingin, terutama pada suhu 15⁰-20⁰C dengan ketinggian 1000-3000 mdpl (Zulkarnain, 2013).

Menurut Sunarjono (2011) kubis atau kol merupakan tanaman semusim. Tanaman kubis berbentuk batang pendek dan beruas-ruas. Tanaman ini berakar tunggang dengan akar sampingnya sedikit ketepi dangkal. Daunnya lebar berbentuk bulat telur. Bunga tersusun dalam tandan dengan mahkota bunga berwarna kuning, buahnya bulat panjang menyerupai polong, polong muda berwarna hijau, setelah tua warnanya kecoklatan dan mudah pecah bijinya berbentuk bulat kecil dan berwarna kecoklatan. Biji yang banyak tersebut menempel pada dinding bilik tengah polong.

Kepala kubis paling tepat digambarkan sebagai tunas akhir tunggal yang besar, yang terdiri atas daun yang saling tumpang tindih secara ketat, yang menempel dan melengkapi batang pendek tidak bercabang. Tinggi tanaman umumnya berkisar 40-60 cm. Pertumbuhan daun memanjang dan saling

menindih. Daun berikutnya secara progresif lebih pendek, lebih lebar, lebih tegak, dan mulai menindih daun yang lebih muda (Zulkarnain, 2013).

2.2 Pertanian Organik

Pertanian organik menjadi suatu sistem produksi pangan yang dilakukan dengan cara-cara yang dapat diterima secara sosial, menguntungkan secara ekonomi dan berlanjut dalam agroekosistem. Pertanian organik bertujuan untuk:

1) menghasilkan produk yang berkualitas dengan kuantitas memadai, 2) membudidayakan tanaman secara alami, 3) mendorong dan meningkatkan siklus hidup biologis dalam ekosistem pertanian, 4) meningkatkan kesuburan tanah untuk jangka panjang, 5) menghindari seluruh bentuk cemaran yang diakibatkan dari penerapan teknik pertanian, 6) memelihara dan meningkatkan keragaman genetik, dan 7) mempertimbangkan dampak sosial dan ekologis (Imani *et al.*, 2018)

Metode dasar pertanian organik yaitu peniadaan penggunaan input bahan kimia eksternal seperti pupuk buatan, pestisida dan bahan sintetik lain. Tujuannya adalah untuk mencegah timbulnya dampak negatif bagi lingkungan dan manusia. Pengolahan tanah secara minimal (*minimum tillage*) sesuai dengan luas lahan budidaya. Penerapan pergiliran dan rotasi tanam berupa pengaturan sistem tanam dengan tujuan untuk menjaga keseimbangan input-output unsur hara dan memutus siklus hidup hama dan penyakit. Penerapan pola tanam polikultur yang berasal dari famili berbeda bertujuan untuk menjaga biodiversitas serangga yang ada pada suatu areal tertentu dan memutus siklus penyakit patogen. Semakin tinggi biodiversitas serangga maka semakin sedikit kemungkinan terjadinya ledakan hama (Sudaryanta, 1999).

2.3 Patogen *Xanthomonas campestris* penyebab penyakit busuk hitam

Brassicaceae atau famili kubis-kubisan merupakan tanaman penting hortikultura yang dibudidayakan pada daerah yang kelembaban cukup tinggi (60 – 69%) dan suhu yang cukup rendah sehingga dapat memunculkan berbagai penyakit. Menurut Pracaya (2001), penyakit penting yang sering menyerang tanaman kubis adalah penyakit busuk hitam yang disebabkan oleh bakteri *X. campestris*, penyebab penyakit busuk hitam ini banyak menyerang tanaman famili *Crucifera* (*Brassicaceae*) seperti kubis, bunga kol, sawi, dan lain-lain. Penyakit ini disebut juga busuk bakteri atau busuk hitam. Infeksi tanaman oleh bakteri ini

menyebabkan batang atau massa bunga yang terserang menjadi busuk berwarna hitam atau coklat sehingga tanaman tidak dapat dipanen. Gejala khas yang ditunjukkan pada daun oleh penyakit busuk hitam berupa bercak mirip huruf V berwarna kuning di bagian tepi ujung daun yang meluas menuju tulang daun bagian tengah kemudian dapat menyebabkan massa bunga busuk berwarna hitam (Sastrosiswojo *et al.*, 2005).



Gambar 1. Daun kubis terserang bakteri *X. campestris* pv. *campestris* (Vidyani, 2013)

Morfologi bakteri *Xanthomonas* sp. menurut Agrios (2005) merupakan bakteri yang berbentuk batang lurus, memiliki ukuran $0,4-1 \times 1,2-3 \mu\text{m}$, motil, memiliki flagel, dan biasanya berwarna kuning jika dikembangkan dalam media agar. Bakteri *Xanthomonas* memproduksi pigmen kuning pada koloninya yang disebut dengan Xanthomonadins. *Xanthomonas campestris* merupakan bakteri gram negatif (Pratama, 2015).

2.4 Bakteri *Indigenous* Endofit pada Tanaman Kubis

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup pada jaringan tanaman yang memiliki peran dalam memicu inang untuk memproduksi fitoaleksin, bertahan dalam kondisi stres, sekaligus sebagai agens pengendalian secara langsung (Yulianti, 2013). Menurut Habazar *et al.*, (2007), menunjukkan bahwa Rhizobakteria dari kelompok rhizosfir, rhizoplan dan endofit mampu menekan perkembangan penyakit. Bakteri endofit dapat diisolasi dari bagian akar, batang, bunga, dan kotiledon. Bakteri dapat masuk melalui proses perkecambahan biji, akar-akar sekunder, stomata, atau melalui kerusakan yang terjadi pada daun.

Mekanisme penekanan penyakit dari bakteri endofit bersifat tidak langsung berupa induksi ketahanan. Hallman *et al.*, (2000) menyatakan strain bakteri endofit dari awal dapat mengkolonisasi jaringan kortek akar dan merangsang pertahanan tanaman. Sifat terpenting bagi bakteri endofit untuk mampu sebagai agen pengendali hayati adalah kemampuan kolonisasi yang cepat pada jaringan inang. Bakteri endofit *indigenus* dinilai mampu beradaptasi pada lingkungan dan lebih kompetitif dibandingkan dengan bakteri non *indigenus* (Yanti *et al.*, 2019).

Bakteri endofit *indigenus* yang berpotensi dapat diperoleh dari tanaman sehat.

2.5 Mekanisme bakteri antagonis dalam menekan bakteri *X. campestris*

Pengendalian penyakit yang ramah lingkungan diperlukan untuk menjaga keseimbangan ekosistem. Pengendalian ramah lingkungan dapat menggunakan agen hayati. Bakteri endofit genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Streptomyces* merupakan bakteri yang dapat digunakan sebagai agen antagonis karena menghasilkan zat antimikroba yang berupa antibiotik. Aktivitas penghambatan senyawa anti mikroba secara umum dapat dilakukan dengan merusak dinding sel dan merubah permeabilitas membran sel. Kerusakan pada membran sel berakibat terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Fahmi, 2014). Bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Bacillus* sp. mampu menghasilkan senyawa antibiotik.

Madigan dan Martinko (2005) melaporkan beberapa strain bakteri anggota genus *Bacillus* dapat menghasilkan senyawa antibiotik antara lain *basitrasin*, *mycobacilin*, *zwittermicin*, *sublilisin*, dan *pumilin*. Menurut Handoko (2014), bahwa *Bacillus* spp. dapat mengeluarkan sedikitnya terdapat 66 jenis antibiotik dan strain. Pada sebuah penelitian eksplorasi *Bacillus* spp., dari perakaran kubis sebagai agen antagonis *X. campestris* bahwa *Bacillus* spp. menunjukkan kemampuan dalam menghasilkan enzim peroksidase. Enzim peroksidase berperan untuk mengubah hidrogen peroksida (H_2O_2) yang beracun bagi bakteri itu sendiri menjadi oksigen. Selain itu, menurut Gusnawaty *et al.*, (2012), *Bacillus* dapat menghidrolisa pati dengan adanya zona putih pada sekitar koloni bakteri. Berdasarkan hal tersebut *Bacillus* spp. memiliki enzim amilase untuk memecah pati menjadi molekul glukosa sehingga dapat diserap oleh sel bakteri dan digunakan untuk proses metabolisme. *Bacillus* spp., menghambat *X. campestris* dengan mekanisme bakteriostatik yaitu suatu kondisi yang disebabkan senyawa

antibakteri sehingga pertumbuhan dan perkembangan bakteri bersifat tetap (statis).

Bakteri *P. fluorescens* dapat menginduksi ketahanan tanaman terhadap penyakit dengan cara menginduksi aktivitas enzim fenil dan produksi asam salisilat. Sedangkan bakteri genus *Streptomyces* dapat menghasilkan antibiotik seperti vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, aktinomisin dan lain-lain. Antibiotik memiliki mekanisme kerja yang beragam antara lain dapat merusak dinding sel, mengganggu fungsi membran sel, serta mengganggu sintesis protein dan asam nukleat (Hasani *et al.*, 2014).



III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2019 sampai dengan Agustus 2020.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoclave, oven, cawan petri, botol media, gelas ukur, tabung reaksi, *sprayer*, *cover glass*, *objek glass*, *jaum ose*, *glass L*, gelas ukur, LAFC, mikropipet, kompor, vortex, pipet, mikropipet, Bunsen, gelas objek, spidol, *beaker glass*, Erlenmeyer, mortal dan pistil, mikroskop, pisau, jangka sorong, penggaris, gunting, jarum suntik, kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alkohol 70% dan 96%, akuades steril, water agar, tisu, KOH, H₂O₂, iodin, kristal violet, *malachite green*, safranin, kloroform, *streptomycin*, spirtus, kertas label, kloroks (NaOCl), aluminium foil, plastik wrap, kertas saring, media NA (Nutrien Agar), media OF (Oksidasi-Fermentatif), media King's B, media YDC (*Yeast Extra-Dextrose Carbonat*), sampel tanaman kubis organik.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu : 1) Pengambilan sampel tanaman kubis organik, 2) isolasi patogen tanaman *X. campestris*, 3) Uji Patogenesitas 4) Eksplorasi dan seleksi bakteri endofit tanaman kubis, 5) Uji antagonisme bakteri endofit tanaman kubis, 6) Karakterisasi bakteri endofit tanaman kubis.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanaman Kubis Organik

Pengambilan sampel tanaman endofit diperoleh dari daun tanaman kubis sehat, serta daun kubis yang bergejala penyakit busuk hitam di lahan Agro Techno Park (ATP) Universitas Brawijaya yang terletak di Desa Sumberbrantas, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu.

3.4.2 Isolasi Bakteri Patogen *X. campestris*

Isolasi bakteri patogen dilakukan dengan cara mengambil bagian tanaman bergejala busuk hitam pada daun kubis. Tanaman kubis yang bergejala kemudian diisolasi dengan memotong bagian antara daun tanaman yang sakit. Kemudian

potongan daun direndam dengan larutan kloroks (NaOCl) selama 1 menit dan alkohol 1 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali, dan dikeringkan diatas tisu. Potongan daun yang sudah disterilisasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml akuades steril dan dibiarkan beberapa menit sampai massa bakteri keluar dan larut dalam akuades. Massa bakteri yang ada pada akuades steril dikocok untuk menghomogenkan larutan. Suspensi yang mengandung bakteri kemudian digoreskan menggunakan jarum ose pada media NA (Nutrient Agar) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (Maji dan Nath, 2015).

Selanjutnya dilakukan proses purifikasi pada setiap koloni bakteri yang tumbuh, sehingga didapatkan koloni tunggal. Isolat bakteri yang diperoleh kemudian diidentifikasi hingga tingkat genus menurut Schaad (2001) dengan beberapa tahapan pengujian yang meliputi uji hipersensitif, uji KOH 3%, Uji pengecatan gram, dan pertumbuhan pada media YDC.

3.4.3 Uji Patogenesitas

Uji Patogenesitas dilakukan untuk mengetahui bakteri yang ditemukan merupakan bakteri patogen *X. campestris* atau bukan. Uji akan dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri patogen yang ditemukan pada tanaman kubis. Bakteri patogen dapat diinokulasikan dengan cara melukai daun tanaman kubis atau menyuntikkan 10 ml suspensi bakteri patogen yang berumur 24-48 jam menggunakan jarum suntik aseptik ke dalam jaringan tanaman. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai gejala muncul setelah inokulasi dan menginfiltrasikan akuades steril sebagai control (Wick, 2010). Bakteri dapat dikatakan sebagai patogen tumbuhan apabila pada bagian tanaman yang inokulasi menunjukkan gejala terserang busuk hitam.

3.4.4 Eksplorasi dan Seleksi Bakteri Endofit Tanaman Kubis

Isolasi bakteri patogen dilakukan dengan cara mengambil bagian tanaman sehat pada daun kubis. Bagian tanaman kubis yang sehat kemudian diisolasi dengan memotong bagian daun tanaman sehat menjadi bagian yang lebih kecil, kemudian menimbang potongan daun sebanyak 1 gram dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun direndam dengan larutan kloroks (NaOCl) selama 3 menit dan alkohol 1 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3

kali, dan dikeringkan diatas tisu. Potongan daun yang sudah disterilisasi kemudian digerus menggunakan mortal dan pistil steril (Triana *et al.*, 2017).

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode dilution plate atau pengenceran bertingkat. Sampel daun kubis yang telah digerus, dilarutkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml akuades steril, kemudian dikocok selama 10 menit.

Suspensi diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam tabung reaksi berukuran 2 ml untuk dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Dari setiap pengenceran diambil sebanyak 1 ml suspensi dan dituangkan ke dalam cawan petri berisi media NA (Nutrien Agar) dan diratakan dengan *stick* L (Kartikawati dan Gusmini, 2018). Kemudian biakan bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Selanjutnya dilakukan proses purifikasi pada setiap koloni bakteri yang tumbuh, sehingga didapatkan koloni tunggal. Bakteri yang merupakan hasil eksplorasi kemudian diseleksi untuk mengetahui kemampuan antagonisnya.

Seleksi bakteri antagonis dapat dilakukan dengan metode spray atau pengkabutan (Kawaguchi *et al.*, 2008). Bakteri endofit daun kubis yang telah diinkubasi 48 jam diambil menggunakan jarum ose kemudian dibuat suspensi dengan aquadest steril. Selanjutnya potongan kertas saring dengan diameter 5 mm dimasukkan ke dalam suspensi selama 1 menit dan ditiriskan diatas tisu steril selama 2 jam. Kemudian kertas saring ditanam di media NA yang berada pada cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, bakteri antagonis dimatikan dengan pemberian kloroform pada tutup cawan petri dalam keadaan terbalik selama 1 jam. Setelah menguap biakan bakteri disemprot dengan suspensi bakteri patogen yang diperoleh. hasil perlakuan diinkubasi selama 24 jam dan daerah hambatan atau zona bening terbentuk dapat diukur dengan menggunakan penggaris.

3.4.5 Uji Antagonisme Bakteri Endofit Tanaman Kubis

Metode uji antagonis menggunakan metode Spray (Kawaguchi *et al.*, 2008). Isolat terbaik dari hasil seleksi kemudian diuji antagonis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Kerapatan suspensi isolat bakteri yang digunakan pada uji ini yaitu 10^5 CFU/ml. Masing-masing perlakuan diinkubasi selama 24 jam dan diukur zona bening yang terbentuk. Perlakuan yang diberikan yaitu :

1. Isolat bakteri kode E1 dan *X. campestris*
2. Isolat bakteri kode E2 dan *X. campestris*
3. Isolat bakteri kode E3 dan *X. campestris*
4. Isolat bakteri kode E4 dan *X. campestris*
5. Isolat bakteri kode E5 dan *X. campestris*
6. Kontrol positif (*streptomycin* dan *X. campestris*)

3.4.6 Karakterisasi Bakteri Endofit Tanaman Kubis

Bakteri endofit tanaman kubis yang telah murni dilakukan identifikasi makroskopis berdasarkan morfologi koloni yaitu bentuk koloni, bentuk bagian tepi koloni, permukaan atas koloni, dan warna koloni. Selanjutnya dilakukan karakterisasi fisiologi bertujuan untuk menentukan genus isolat bakteri. Metode yang digunakan berdasarkan Schaad (2001). Karakterisasi ini meliputi uji hipersensitif, uji Gram dengan kelarutan KOH 3% dan pewarnaan Gram, uji oksidatif fermentatif, uji produksi pigmen *fluorescent* dengan menggunakan media King's B, dan uji pertumbuhan pada media *Yeast Extract-Dextrose Carbonat* (YDC).

1. Uji Hipersensitif

Uji hipersensitif merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri merupakan bakteri patogen atau bukan yang diuji dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri pada daun tanaman tembakau. Setelah inokulasi dilakukan pada tanaman tembakau, reaksi positif akan ditunjukkan dengan adanya gejala nekrosis pada bagian daun yang diinokulasi bakteri tersebut.

2. Uji Gram

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram negatif dengan bakteri Gram positif. Uji Gram dilakukan dengan meletakkan bakteri sebanyak satu ose diatas gelas objek. Kemudian bagian bawah gelas objek dipanaskan diatas lampu bunsen dan ditetesi dengan menggunakan kristal violet. Didiamkan 1 menit dan dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan tisu. Kemudian bakteri ditetesi kembali dengan menggunakan iodine dan diamkan selama 3 detik. Setelah itu dicuci dengan menggunakan air bersih mengalir dan keringkan dengan tisu. Warna dihilangkan dengan menggunakan alkohol, didiamkan dengan tisu 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir.

Lalu ditetesi dengan safranin selama satu menit dan dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan pengamatan apabila warna ungu kebiru-biruan menunjukkan Gram positif tetapi apabila menunjukkan warna merah menunjukkan Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang terbuat dari peptidoglikan sehingga mampu mempertahankan warna ungu yang berasal dari kristal violet. Sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang berasal dari lipid sehingga pada saat ditetesi dengan safranin makan dinding sel ini akan menyerap warna dari safranin sehingga terlihat berwarna merah (Pelczar dan Chan, 2007).

b. Uji KOH

Uji KOH dilakukan dengan mengambil KOH, ditetaskan diatas gelas objek secukupnya. Bakteri yang akan diuji diambil menggunakan ose dan diletakkan diatas gelas objek, diaduk atau diratakan. Kemudian dilakukan pengamatan dengan cara sedikit mengangkat larutan dengan jarum ose berulang setinggi 0,5-1 cm. Apabila saat ose diangkat terdapat lendir seperti benang berarti bakteri merupakan Gram negatif. Sedangkan apabila tidak terdapat lendir dan tidak lengket maka bakteri bersifat Gram positif.

3. Pewarnaan Spora

Uji dilakukan untuk mengetahui bakteri memiliki spora atau tidak. Isolat bakteri yang telah berumur 24 jam diambil dengan jarum ose dan dibuat suspensi dengan akuades di atas gelas objek. Isolat difiksasi diatas bunsen, ditetesi dengan *malachite green* sebanyak 2 tetes dan diratakan. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Bakteri difiksasi diatas bunsen, diberi safranin dan dibiarkan selama 30 detik. Gelas objek dicuci dengan akuades dan diamati dibawah mikroskop.

Apabila terdapat spora berwarna hijau pada saat pengamatan maka bakteri tersebut mampu membentuk spora.

4. Uji Oksidatif-Fermentatif

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menguraikan glukosa. Uji ini dilakukan dengan menggunakan media basal yang terdiri dari pepton 2gr, NaCl 5 gr, KH₂PO₄ 0,3 gr, dan *bromothymolblue* (larutan 1%) 3 ml berdasarkan formula Hugh dan Leifson (1953) yang telah mendeskripsikan secara signifikan taksonomi bakteri Gram negatif yang

memetabolisme karbohidrat berdasarkan oksidasi atau fermentasi. Bakteri diinokulasi pada dua medium tegak, yang salah satu tabung ditutup parafin cair steril setinggi 1 cm dari permukaan medium, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Tabung yang diinokulasikan bakteri salah satunya ditutup dengan parafin atau agar steril dan satunya lagi tidak ditutup dengan parafin yang berfungsi untuk menghambat oksigen sehingga oksigen tidak akan masuk dan reaksi yang signifikan akan dapat diamati. Medium pada tabung tanpa paraffin cair steril berubah warna dari biru menjadi kuning dan tabung lainnya tetap biru berarti bakteri bersifat oksidatif. Medium pada kedua tabung berubah warna dari biru menjadi kuning berarti bakteri bersifat fermentatif. Medium dikedua tabung berubah berarti bakteri memecah glukosa dalam medium.

5. Uji Katalase

Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri tertentu untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri aerob atau anaerob. Bakteri dapat memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Pada uji katalase, koloni bakteri diambil satu ose secara aseptis dan diinokulasikan pada gelas objek. Kemudian dipipet dengan pipet tetes, 3% H_2O_2 ditetaskan pada gelas objek secukupnya. Setelah itu diamati gelembung untuk hasil positif dan tidak ada gelembung untuk hasil negatif.

6. Uji Pigmen *Fluorescent* pada Media King's B

Uji pigmen *fluorescent* dilakukan pada media King's B dengan komposisi pepton protease 20 g, KH_2PO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, gliserol 15 ml dan agar 15 g (untuk 1 liter). Isolat bakteri yang diremajakan pada media NA diambil dengan menggunakan jarum ose lalu digoreskan pada media King's B dan diinkubasi selama 24-48 jam. Bakteri yang mengeluarkan warna hijau-kebiruan dan berpendar merupakan bakteri *Pseudomonas* dari golongan "fluorescent". Pengujian ini bertujuan untuk membedakan bakteri *Pseudomonas* dengan bakteri yang lain.

7. Pertumbuhan pada Media YDC (*Yeast Extra-Dextrose Carbonat*)

Media YDC merupakan media khusus yang terdiri dari *yeast extract* 10 g, *dextrose (glucose)* 20 g, $CaCO_3$ 20 g, agar 15g (untuk 1 liter). Pengujian ini bertujuan membedakan bakteri *Erwinia* sp. dan *Pantoea* sp. Isolat bakteri yang

berumur 24 jam ditumbuhkan pada media YDC dengan cara menggosokkan bakteri pada media. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24-48 jam, dengan melihat warna koloni yang terbentuk yaitu warna putih atau kuning pada media YDC. Apabila bakteri menunjukkan warna kuning maka bakteri tersebut berasal dari genus *Pantoea*. Apabila koloni tidak berwarna kuning menunjukkan bakteri genus *Erwinia*.

3.5 Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan pada penelitian ini merupakan data kuantitatif yaitu pengamatan zona hambat yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofit daun tanaman kubis yang bersifat antagonis, diamati sebanyak 3 kali dimulai dari 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong atau penggaris secara vertical dan horizontal kemudian dihitung dengan rumus (Wuryandari *et al.*, 2008) sebagai berikut :

$$\text{Ukuran Zona Hambat} = \frac{DV + DH}{2}$$

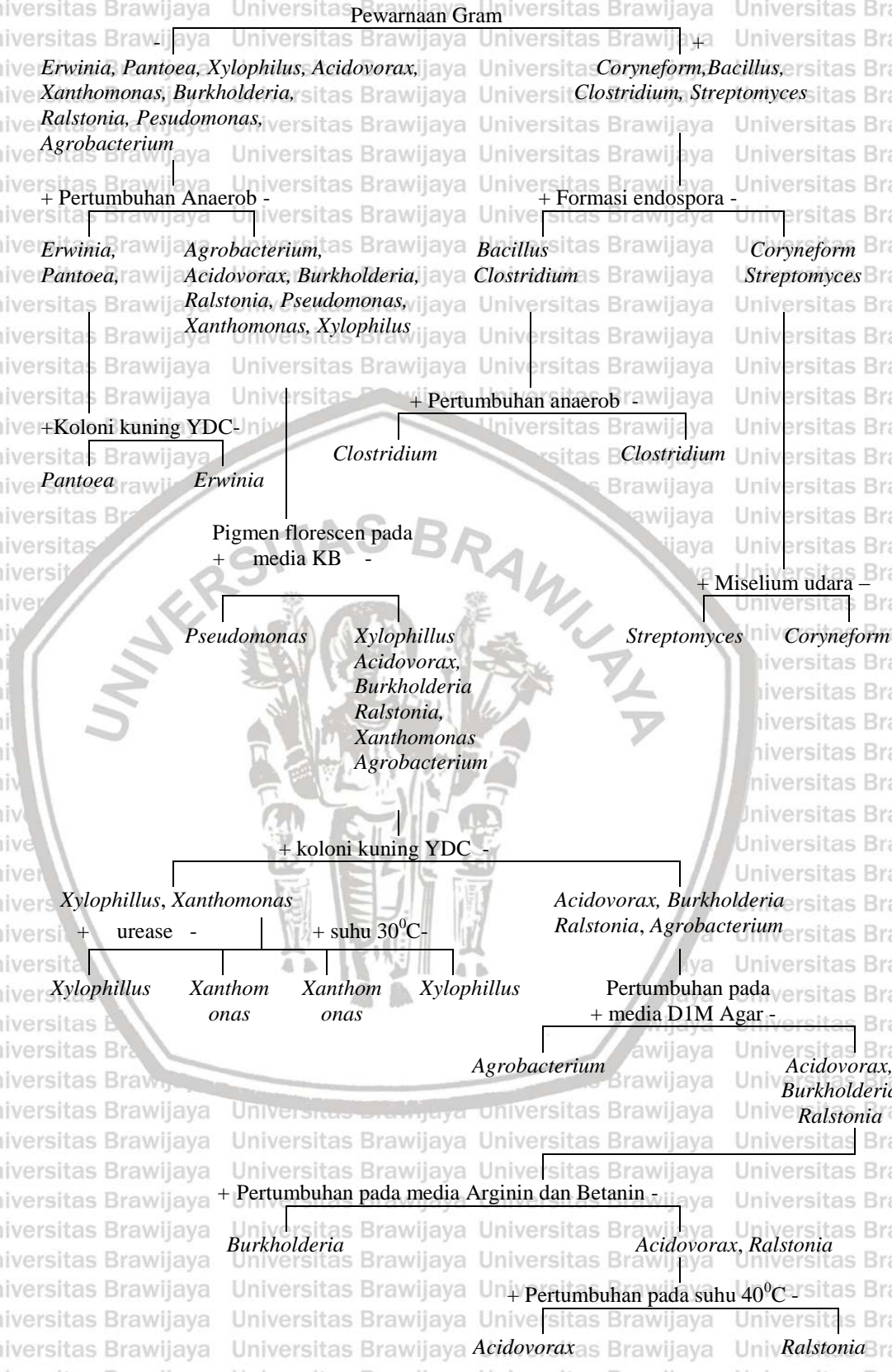
Keterangan :

Dv = Diameter zona bening vertikal

Dh = Diameter zona bening horizontal

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dan apabila berbeda nyata diuji lanjut dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) dengan taraf 5 % menggunakan aplikasi SPSS.



Gambar 2. Bagan alir identifikasi bakteri hingga tingkat genus (Schaad, 2001)



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Isolasi Bakteri Patogen *X. campestris* pada kubis

Bakteri patogen *X. campestris* diisolasi dari tanaman kubis organik yang bergejala terserang penyakit busuk hitam pada lahan pertanian organik ATP

Universitas Brawijaya di Desa Sumberbrantas, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu.

Gejala penyakit busuk hitam yang ditemukan yaitu pada daun terdapat bercak

mirip huruf V berwarna kuning di bagian tepi ujung daun yang meluas menuju tulang daun bagian tengah (Gambar 3). Sesuai dengan pernyataan Pratama (2015)

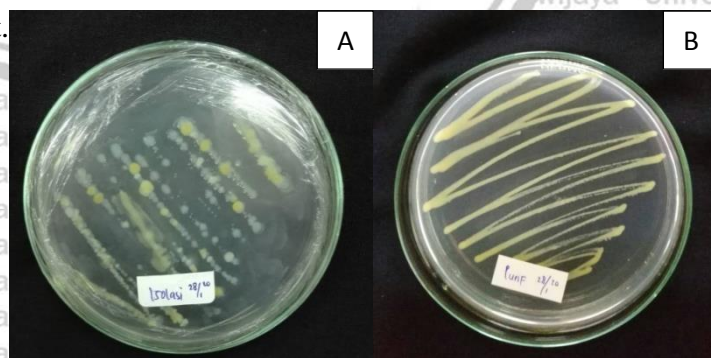
bahwa penyakit busuk hitam ditandai dengan daun menguning yang berbentuk huruf V di sepanjang tepi daun yang mengarah ke tengah daun dan akhirnya seluruh daun menguning.



Gambar 3. Tanaman kubis bergejala terserang penyakit busuk hitam

Isolasi bakteri patogen ditumbuhkan pada media NA selama 24 jam, kemudian dipurifikasi untuk mendapatkan koloni bakteri tunggal (Gambar 4).

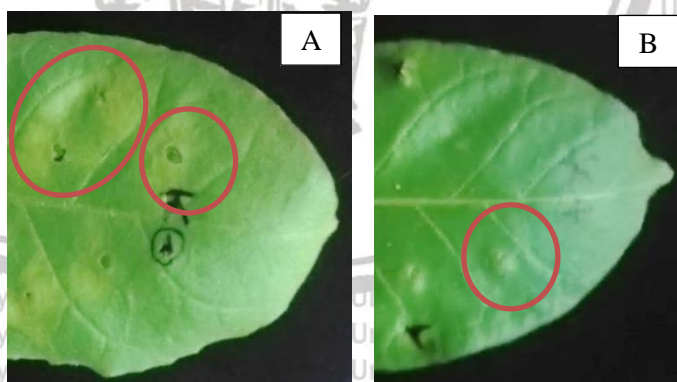
Selanjutnya isolat diuji patogenesis dan uji Gram untuk menentukan genus bakteri tersebut.



Gambar 4. Isolasi patogen *X. campestris*: (A) pertumbuhan pada media NA 24 jam; (B) hasil purifikasi isolat patogen

Secara morfologi isolat bakteri patogen *X. campestris* yang diperoleh mempunyai ciri koloni berwarna kuning keputihan atau kuning keputihan jika ditumbuhkan pada media NA. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pratama (2015) bahwa bakteri *Xanthomonas* memproduksi pigmen kuning pada koloninya yang disebut dengan Xanthomonadins. Karakterisasi bakteri patogen dilakukan dengan uji hipersensitif, uji KOH dan uji pewarnaan Gram.

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui bakteri bersifat patogen atau bukan. Pengujian dilakukan dengan cara menyuntikkan suspensi bakteri patogen *X. campestris* pada daun tembakau, dan aquades sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setelah 48 jam penyuntikkan. Pada pengujian ini diperoleh hasil bahwa pada daun tembakau yang disuntik suspensi bakteri patogen menunjukkan gejala kekuningan dan nekrosis (Gambar 5A). Sedangkan pada daun tembakau yang disuntik dengan aquades tidak menunjukkan gejala (Gambar 5B). Reaksi hipersensitif positif pada daun tembakau akan menimbulkan nekrosis apabila bakteri bersifat patogen dan tidak akan menimbulkan nekrosis apabila bakteri tidak bersifat patogen. Klement dan Goodman (1967) menyatakan bahwa timbulnya nekrosis terjadi saat pengenalan patogen sehingga timbul usaha tanaman untuk menghambat pertumbuhan patogen dengan mematikan sel yang sudah terserang patogen.

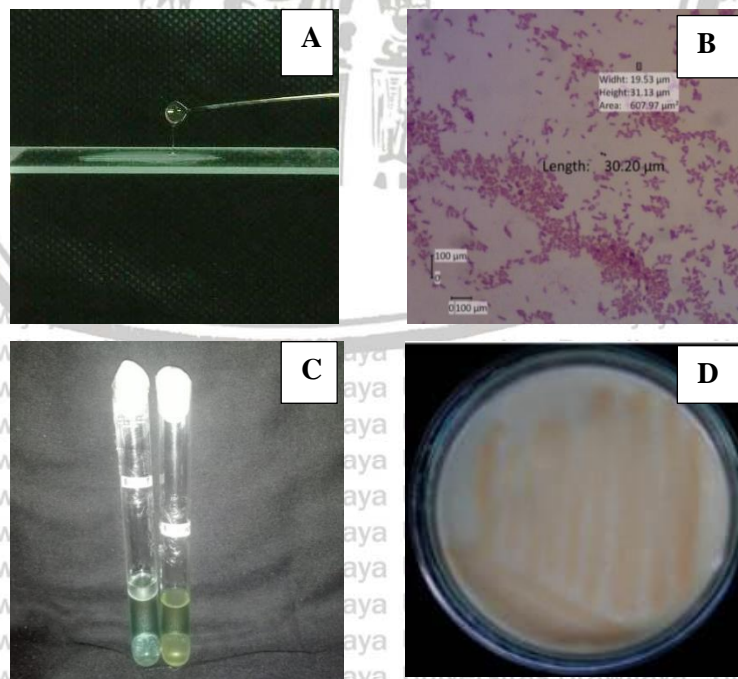


Gambar 5. Uji hipersensitif pada daun tembakau 48 jam: (A) Reaksi positif pada daun tembakau menimbulkan gejala kekuningan dan nekrosis; (B) Reaksi negatif pada daun yang disuntik dengan aquades.

Pengujian KOH pada bakteri patogen dilakukan dengan cara meneteskan larutan KOH 3% pada object glass yang telah diberi satu ose bakteri kemudian mengaduk dan meratakannya dengan menggunakan ose. Berdasarkan pengamatan

yang dilakukan diperoleh hasil bahwa bakteri *X. campestris* dapat menghasilkan lendir ketika ditarik pada ose, sehingga menunjukkan bahwa bakteri *X. campestris* merupakan bakteri gram negatif (Gambar 6A). Schaad (2001) menyatakan bahwa pada uji KOH apabila bakteri berlendir dan lengket menunjukkan bakteri Gram negatif sedangkan koloni yang lepas dan tidak lengket menunjukkan bakteri Gram positif.

Uji pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif berdasarkan dinding selnya. Apabila terjadi perubahan pada hasil pewarnaan menjadi merah berarti bakteri termasuk dalam Gram negatif, sedangkan jika hasil pewarnaan berwarna ungu maka bakteri bersifat Gram positif. Hasil pewarnaan gram pada bakteri *X. campestris* menunjukkan bahwa bakteri termasuk dalam bakteri Gram negatif, karena terjadi perubahan warna merah pada saat diamati dibawah mikroskop (Gambar 6B). Pengamatan dibawah mikroskop juga menunjukkan morfologi bakteri *X. campestris* berbentuk batang, beberapa bakteri membentuk rantai dan berkoloni. Hal ini sesuai dengan pendapat Fahmi (2014). bahwa bakteri *X. campestris* berbentuk batang, berukuran $(0,7-3,0) \mu\text{m} \times (0,4-0,5) \mu\text{m}$, membentuk rantai, berkapsula, tidak berspora, dan bergerak dengan satu flagelum polar.

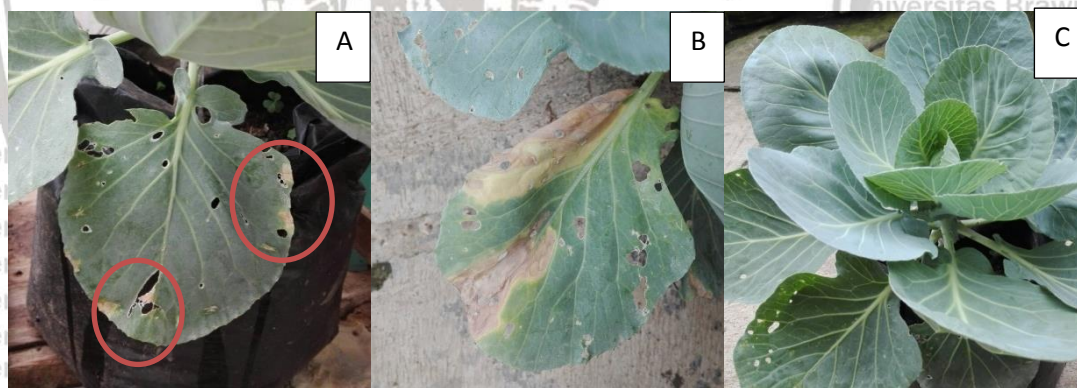


Gambar 6. Karakterisasi fisiologi isolat patogen: (A) Pengujian KOH; (B) Pewarnaan Gram; (C) Uji OF; (C) Uji pertumbuhan pada YDC

Pada pengujian oksidatif fermentatif menunjukkan adanya perubahan pada salah satu tabung berubah menjadi warna kuning, yang berarti bakteri bersifat oksidatif (Gambar 6C). Sedangkan pada pengujian pertumbuhan pada media *Yeast Extra-Dextrose Carbonat* (YDC) menunjukkan bahwa isolat bakteri patogen berwarna kuning (Gambar 6D). Maka dari itu, isolat bakteri patogen dapat digolongkan dalam genus *Xanthomonas*. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan (Maji dan Nath, 2015) bahwa bakteri *X. campestris* termasuk bakteri gram negatif penyebab penyakit busuk hitam yang dapat menghasilkan koloni berwarna kuning halus, koloni berkilau dan membentuk elevasi yang cembung.

4.2 Hasil Uji Patogenitas pada Tanaman Kubis

Uji patogenitas pada tanaman kubis dilakukan untuk mengetahui bakteri *X. campestris* yang didapatkan bersifat patogen dan menimbulkan gejala yang sama dengan gejala di lapang. Pengujian ini dilakukan dengan menyuntikkan suspensi bakteri patogen yang berumur 48 jam dan melukai pada bagian ujung daun kubis dengan menggunakan gunting yang telah dicelupkan pada suspensi tersebut.



Gambar 7. Uji patogenitas pada tanaman kubis: (A) Gejala menguning pada tepi daun mulai muncul pada 8 HSI; (B) Gejala meluas menuju tengah daun dan terjadi nekrosis pada 19 HSI; (C) Tanaman kontrol

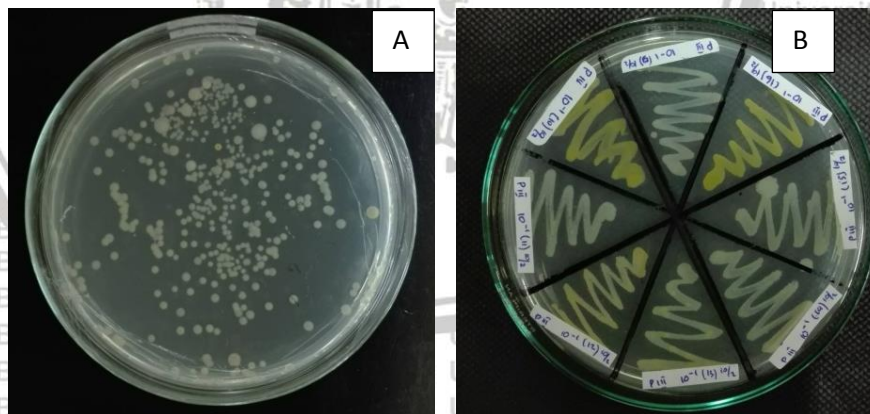
Pengamatan yang dilakukan setiap hari menunjukkan hasil bahwa gejala yang muncul sesuai dengan gejala serangan *X. campestris*. Gejala awal yang muncul pada tanaman adalah daun menguning pada bagian tepi daun pada 8 HSI (Gambar 7A). Selanjutnya daun yang menguning akan mengalami nekrosis membentuk pola huruf V yang mengarah ke tengah daun pada 19 HSI (Gambar 7B), dan daun pada tanaman kontrol terlihat sehat tidak terdapat gejala (Gambar

7C). Hal ini sesuai dengan pernyataan Barroroh (2012) bahwa patogen *X. campestris* menimbulkan gejala mula-mula ditepi daun terdapat daerah yang berwarna kuning pucat yang kemudian meluas menuju ke bagian tengah daun.

Pada daerah tulang daun berwarna coklat tua atau hitam. Maji dan Nath (2015) juga menyatakan bahwa patogen *X. campestris* dapat menyebabkan jaringan daun menguning luas dan terjadi nekrosis, pada serangan lanjut dapat menyebabkan jaringan pembuluh batang hitam dan tanaman menjadi layu.

4.3 Hasil Seleksi Bakteri Antagonis Terhadap *X. campestris*

Tahap eksplorasi dilakukan untuk mendapatkan jenis bakteri yang berbeda dan dalam jumlah banyak yang kemudian akan dilakukan seleksi dan diuji antagonis untuk mengetahui kemampuannya dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen. Berdasarkan hasil eksplorasi yang diperoleh dengan cara mengisolasi bakteri dari endofit tanaman kubis organik dan diencerkan hingga 10^{-5} didapatkan 119 bakteri. Hasil pengenceran sebanyak tersebut kemudian ditanam ke media NA dan diinkubasi selama 24 jam (Gambar 8A). Koloni bakteri yang muncul kemudian dilakukan purifikasi dan diamati kenampakan morfologinya (Gambar 8B) kemudian isolat diuji hipersensitif pada tembakau dan dilakukan seleksi antagonis.



Gambar 8. Hasil eksplorasi bakteri endofit: (A) pertumbuhan pada media NA 24 jam; (B) purifikasi bakteri hasil eksplorasi

Hasil purifikasi bakteri kemudian dilakukan pengujian hipersensitif pada tanaman tembakau untuk mengetahui bakteri tersebut termasuk bakteri patogen atau bukan. Pada pengujian hipersensitif daun tembakau yang diamati selama 48 jam dari 119 bakteri diperoleh hasil bahwa 62 bakteri bersifat patogen ditandai

dengan adanya gejala kuning dan nekrosis pada daun tembakau, sedangkan 57 bakteri bersifat non patogen dengan tidak menimbulkan gejala setelah diuji hipersensitif (Gambar 9). Reaksi hipersensitif positif pada daun tembakau akan menimbulkan nekrosis apabila bakteri bersifat patogen dan tidak akan menimbulkan nekrosis apabila bakteri tidak bersifat patogen. Sesuai pernyataan Klement dan Goodman (1967) bahwa timbulnya nekrosis pada daun tembakau terjadi saat inokulasi patogen sehingga timbul usaha tanaman untuk menghambat pertumbuhan patogen dengan mematikan sel yang sudah terserang patogen.



Gambar 9. Reaksi hipersensitif pada daun tembakau bakteri endofit hasil eksplorasi

Selanjutnya dari 57 bakteri yang telah diuji hipersensitif dan bersifat non patogen kemudian diseleksi untuk mendapatkan bakteri yang bersifat antagonis. Seleksi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *X. campestris*. Hasil seleksi antagonis menunjukkan terdapat 13 isolat bakteri yang bersifat antagonis terhadap *X. campestris* (Tabel 1) yang ditandai dengan adanya zona hamabat yang dihasilkan isolat bakteri tersebut. Strobel dan Daisy (2003) menyatakan bahwa zona hambat yang dibentuk oleh bakteri bakteri antagonis menandakan bakteri tersebut dapat menghasilkan antibiotik. Sehingga bakteri tersebut dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati terhadap patogen tanaman. Hasil seleksi menunjukkan bahwa dari 13 isolat yang dapat menghasilkan zona hambat, terdapat 5 isolat yang menghasilkan zona hambat tertinggi yaitu isolat E33, E79, E95, E102 dan E109. Kelima isolat tersebut kemudian digunakan untuk perlakuan pada uji penghambatan selanjutnya.

Tabel 1. Zona Bening isolat bakteri endofit tanaman kubis dengan *X. campestris* setelah 24 jam inokulasi

| Kode Isolat | Zona Bening (cm) | Kode Isolat | Zona Bening (cm) |
|-------------|------------------|-------------|------------------|
| E 3 | 0 | E 75 | 0 |
| E 5 | 0 | E 76 | 0 |
| E 8 | 0 | E 77 | 0 |
| E 9 | 1,25 | E 78 | 0 |
| E 10 | 1,75 | E 79 | 2,85* |
| E 11 | 1,45 | E 80 | 0 |
| E 12 | 0 | E 81 | 0 |
| E 13 | 0 | E 82 | 0 |
| E 14 | 0 | E 84 | 0 |
| E 15 | 0 | E 86 | 0 |
| E 16 | 0 | E 89 | 0 |
| E 28 | 0 | E 93 | 0 |
| E 33 | 2,00* | E 95 | 3,10* |
| E 34 | - | E 102 | 2,75* |
| E 35 | 0 | E 109 | 3,15* |
| E 40 | 0 | E 110 | 0 |
| E 41 | 1,55 | E 111 | 0 |
| E 47 | 0 | E 112 | 0 |
| E 48 | 0 | E 113 | 0 |
| E 49 | 0 | E 115 | 0 |
| E 50 | 0 | E 118 | 0 |
| E 55 | 0 | E 121 | 0 |
| E 57 | 0 | E 123 | 1,40 |
| E 58 | 0 | E 125 | 0 |
| E 67 | 1,15 | E 126 | 0 |
| E 68 | 1,05 | E 133 | 1,20 |
| E 73 | 0 | E 134 | 0 |

Keterangan : (*) digunakan untuk uji selanjutnya

4.4 Potensi Bakteri Antagonis terhadap Patogen *X. campestris*

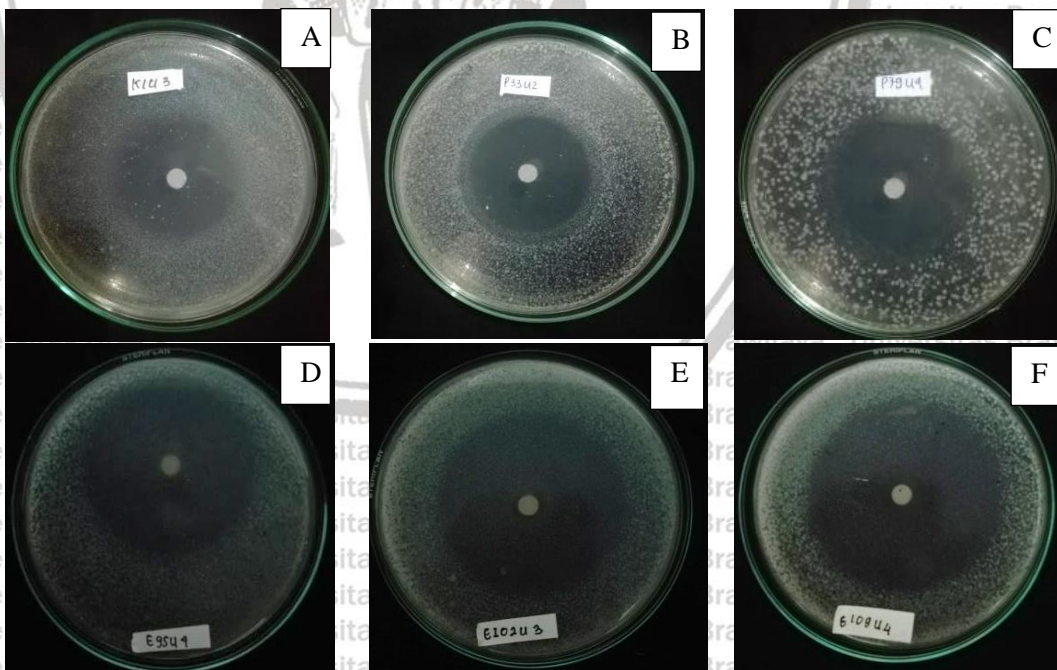
Kelima isolat bakteri terpilih diuji antagonis menggunakan RAL 6 perlakuan dengan 4 ulangan dan diuji lanjut dengan Uji Duncan taraf 5%.

Tabel 2. Rerata Diameter Zona Hambat Bakteri Endofit Dalam Mengendalikan Patogen *X. campestris*

| Perlakuan | Diameter Zona Hambat (cm) | | |
|---------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | 24 JSI (X ± SD) | 48 JSI (X ± SD) | 72 JSI (X ± SD) |
| Isolat E 33 | 3,95 ± 0,20ab | 3,78 ± 0,23b | 3,70 ± 0,19b |
| Isolat E 79 | 4,31 ± 0,47b | 4,18 ± 0,45b | 4,08 ± 0,4b |
| Isolat E 95 | 5,48 ± 0,12c | 5,29 ± 0,22c | 5,13 ± 0,15c |
| Isolat E 102 | 5,35 ± 0,17c | 5,18 ± 0,12c | 5,00 ± 0,14c |
| Isolat E 109 | 5,44 ± 0,47c | 5,36 ± 0,39c | 5,26 ± 0,39c |
| <i>Streptomycin</i> | 3,64 ± 0,13a | 3,23 ± 0,09a | 3,08 ± 0,07a |

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%. SD: Standar Deviasi. JSI: Jam Setelah Inkubasi

Berdasarkan pengujian antagonis secara *in vitro* yang telah diuji didapatkan hasil (Tabel 2) bahwa seluruh isolat memiliki pengaruh penghambatan terhadap pertumbuhan patogen *X. campestris*. Pada 24 JSI, 48 JSI, dan 72 JSI, zona hambat terbesar dihasilkan oleh isolat dengan kode E95, E102, E109, yang berbeda nyata dengan kontrol. Zona hambat lebih kecil dihasilkan oleh isolat E33 dan E79. Trisia (2018) menyatakan bahwa zona hambat dibagi menjadi tiga kategori dimana daerah zona hambatan ≥ 20 mm termasuk kategori sangat kuat, 10-20 mm termasuk kategori kuat, 5-10 mm termasuk kategori sedang, dan ≤ 5 mm termasuk kategori lemah. Berdasarkan hal tersebut maka daya hambat kelima isolat bakteri antagonis termasuk dalam kategori sangat kuat. Dari kelima isolat bakteri antagonis menunjukkan bahwa isolat E109 memiliki kemampuan menghambat patogen *X. campestris* lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Perbedaan zona hambat yang terjadi pada kelima isolat (Gambar 10) disebabkan oleh perbedaan jenis bakteri yang tumbuh pada media tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sallytha (2014), variasi zona hambat terjadi karena adanya perbedaan daya antagonisme dan antibiotik yang dihasilkan pada tiap isolat bakteri.



Gambar 10. Kenampakan zona hambat bakteri antagonis dengan *patogen X. campestris*, (A). Kontrol, (B). E33, (C). E79, (D). E95, (E). E102, (F). E109

Adanya zona hambat menandakan bahwa bakteri antagonis mampu menghasilkan antibiotik. Sesuai dengan pernyataan Lindow dan Brandl (2003) mekanisme antagonisme yang umumnya dilakukan bakteri yaitu dengan menggunakan hasil dari metabolit sekunder seperti antibiotik, enzim, hormone dan toksin. Beberapa bakteri antagonis memproduksi senyawa bioaktifator yang dapat berkompetisi dengan mikroorganisme lainnya untuk mendapatkan ruang dan nutrisi untuk tumbuh. Adapun aktivitas antibiotik menurut Tasnim *et al.*, (2011) meliputi perusakan dan penghambatan pembentukan dinding sel, perusakan permeabilitas dinding sel, serta penghambatan kerja enzim yang berperan dalam pertumbuhan sel bakteri. Oleh karena itu pertumbuhan bakteri patogen dapat dihambat sehingga tidak menyebabkan penyakit pada suatu tanaman.

4.5 Karakterisasi Bakteri Endofit Kubis

4.5.1 Karakterisasi Morfologi

Bakteri hasil perlakuan yang telah diketahui penghambatannya kemudian diidentifikasi secara morfologi. Pengamatan morfologi dilakukan pada koloni tunggal bakteri yang telah ditumbuhkan pada media NA dan distreak dengan metode kuadran. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 3.

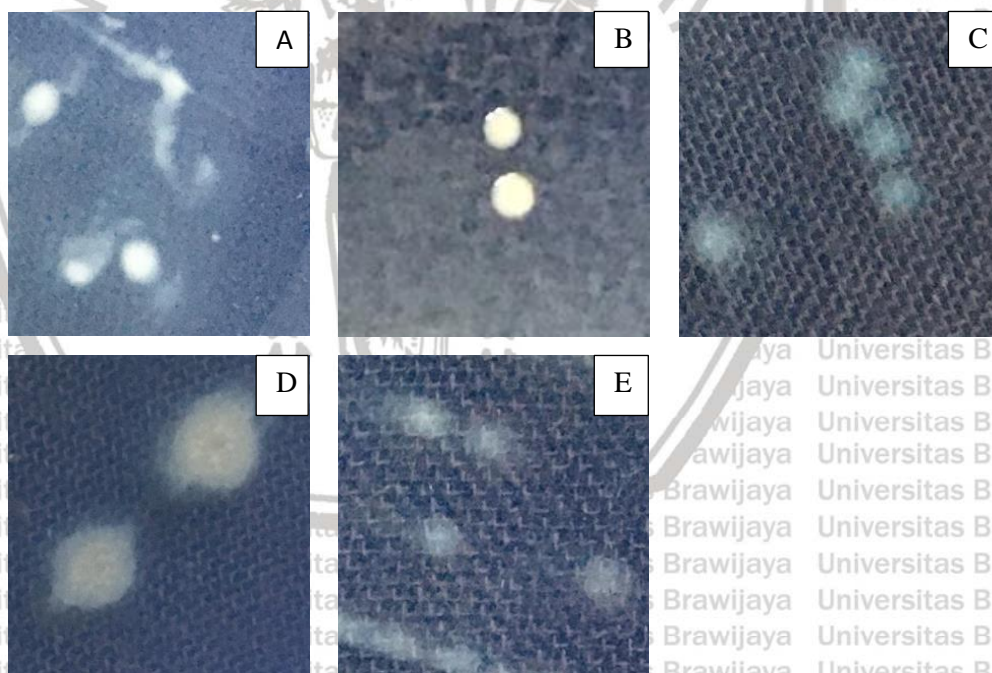
Tabel 3. Karakteristik morfologi koloni tunggal bakteri

| Kode Isolat | Warna | Bentuk Koloni | Tepian | Elevasi | Permukaan Koloni | Bentuk Sel |
|-------------|------------------|---------------|------------|---------|------------------|------------|
| E 33 | Putih susu | Bulat | Rata | Cembung | Halus | Basil |
| E 79 | Putih kekuningan | Bulat | Tidak Rata | Timbul | Halus | Basil |
| E 95 | Putih kekuningan | Bulat | Rata | Cembung | Halus | Basil |
| E 102 | Putih kekuningan | Bulat | Rata | Cembung | Kasar | Basil |
| E 109 | Putih kekuningan | Bulat | Rata | Cembung | Halus | Basil |

Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media NA dan distreak dengan metode kuadran untuk mendapatkan koloni tunggal diamati setelah berumur 24-48 jam. Karakterisasi morfologi bertujuan untuk mengamati morfologi koloni maupun morfologi sel bakteri (Sabdaningsih *et al.*, 2013). Karakterisasi morfologi yang diamati meliputi bentuk koloni, warna, tepian, permukaan koloni dan elevasi (Tabel 3). Bentuk sel bakteri dilakukan saat pewarnaan Gram yang diamati

dibawah mikroskop. Karakterisasi morfologi sesuai yang dilakukan Sabdaningsih *et al.*, (2013) meliputi warna, bentuk, tepi, dan elevasi. Pengamatan bentuk bakteri menurut Jannah *et al.*, (2017) yaitu bakteri mempunyai 3 bentuk dasar meliputi kokus, basil dan spiral. Kokus merupakan bakteri yang mempunyai bentuk bulat seperti bola-bola kecil. Basil yang mempunyai bentuk batang kecil dan silindris. Sedangkan spiral yaitu bakteri yang berbentuk bengkok atau berbengkok-bengkok seperti spiral.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri memiliki warna yang berbeda (Gambar 11). Isolat bakteri E33 dan E79 berwarna putih susu, sedangkan isolat E95, E102 dan E109 berwarna putih kekuningan. Kelima isolat bakteri memiliki tepi koloni yang rata. Pada pengamatan elevasi hampir semua isolat memiliki elevasi cembung, namun isolat E79 memiliki elevasi timbul. Selain itu pada isolat E33, E95, dan E109 memiliki permukaan koloni yang halus, sedangkan pada isolat E79 dan E 102 memiliki permukaan koloni kasar. Seluruh isolat memiliki bentuk sel yang sama yaitu berbentuk basil.



Gambar 11. Kenampakan morfologi koloni bakteri antagonis: (A) isolat E33; (B) isolat E79; (C) isolat E95; (D) isolat E102; (E) isola 109

4.5.2 Karakterisasi Fisiologi

Karakterisasi Fisiologi dilakukan untuk mengetahui genus suatu bakteri.

Pengamatan fisiologi meliputi pewarnaan Gram, uji KOH 3%, pewarnaan spora,

uji katalase, uji media Kings B dan uji media YDC. Hasil karakterisasi fisiologi dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini.

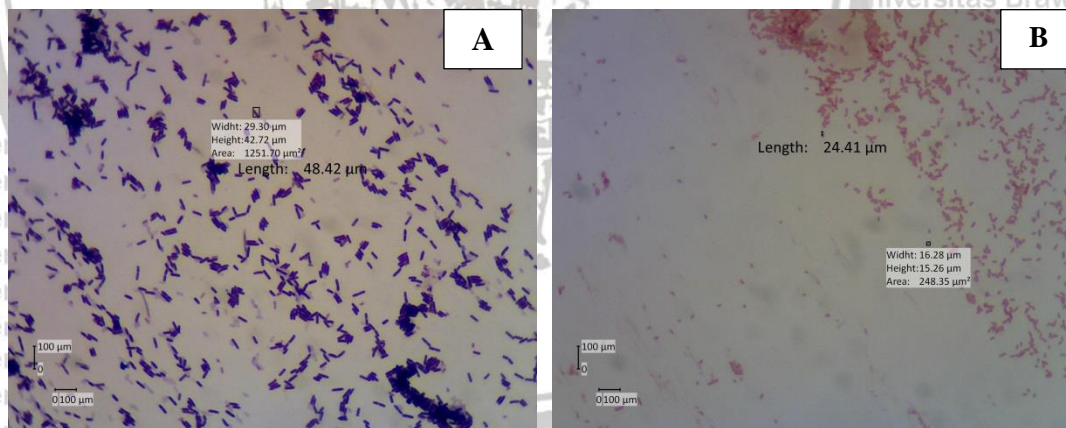
Tabel 4. Karakterisasi fisiologi 5 genus bakteri antagonis

| Kode Isolat | Pewarnaan Gram | Uji KOH 3% | Pewarnaan Spora | Uji Katalase | Uji OF | Uji Kings B | Uji YDC |
|-------------|----------------|------------|-----------------|--------------|--------|-------------|---------|
| E 33 | + | + | - | + | Oks | - | TD |
| E 79 | - | - | - | + | Fer | - | TD |
| E 95 | - | - | - | + | Oks | + | TD |
| E 102 | - | - | - | + | Oks | + | TD |
| E 109 | - | - | - | + | Oks | + | TD |

Keterangan: (-)= reaksi negatif, (+)= reaksi positif, (TD)= Tidak Diuji, Fer= Fermentatif, Oks= Oksidatif

1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui warna sel dan bentuk sel bakteri. Berdasarkan pengujian gram yang telah dilakukan diperoleh hasil bahwa isolat E33 berwarna biru keunguan dengan bentuk sel batang menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk dalam gram positif (Gambar 12A), sedangkan isolat E79, E95, E102, E109 berwarna merah dengan bentuk sel batang yang menunjukkan bahwa keempat termasuk bakteri Gram negatif (Gambar 12B).



Gambar 12. Warna dan bentuk sel pada pewarnaan Gram: (A) isolat E33; (B) isolat E102

Bakteri gram positif ditandai dengan sel bakteri berwarna ungu. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nurhidayati *et al.*, (2015) bahwa warna ungu atau violet dari bakteri Gram positif berasal dari kristal violet-yodium yang dipertahankan meskipun telah diberi larutan alkohol saat pewarnaan Gram. Hal ini dikarenakan bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan

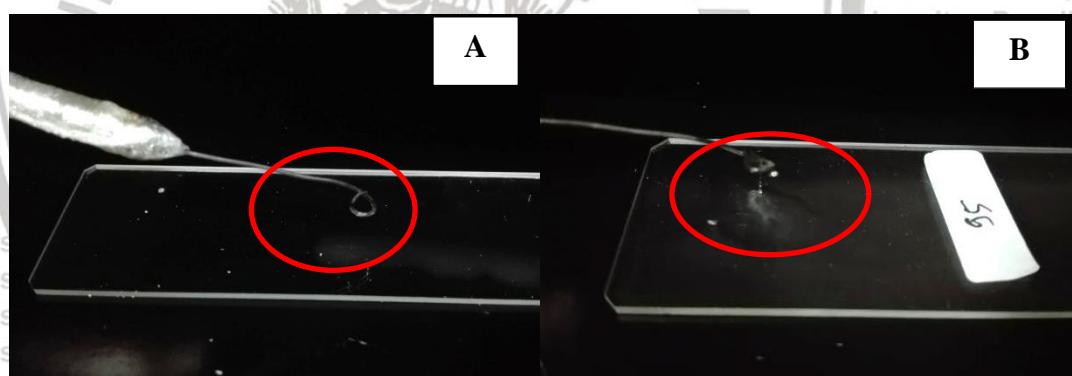
peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi (Lay, 1994).

2. Uji KOH 3%

Uji KOH dilakukan untuk mengetahui bakteri termasuk dalam Gram positif atau negatif dengan menggunakan larutan kalium hidroksida (KOH) 3%.

Apabila dalam pengujian bakteri berlendir dan lengket menunjukkan bahwa bakteri termasuk dalam Gram negatif, sebaliknya jika pengujian bakteri tidak lengket dan tidak berlendir termasuk dalam bakteri Gram positif (Schaad, 2001).

Hasil uji KOH 3% pada kelima isolat menunjukkan bahwa isolat E33 (Gambar 13A) merupakan bakteri gram positif karena tidak menunjukkan adanya lendir atau lengket, sedangkan isolat E79, E95, E102 dan E109 merupakan bakteri gram negatif karena berlendir dan lengket pada pengujian (Gambar 13B). Sesuai dengan pernyataan Lelliot dan Stead (1987) bahwa koloni bakteri yang terlihat berlendir dan melekat menunjukkan reaksi positif, sedangkan koloni yang terlihat berlendir dan terlepas menunjukkan reaksi negatif.

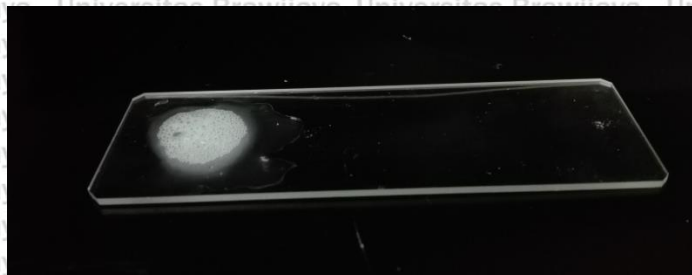


Gambar 13. Reaksi pengujian KOH 3%: (A) isolat E33 tidak berlendir; (B) isolat E95 berlendir

3. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui suatu bakteri dapat menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan adanya gelembung saat ditetesi larutan hydrogen peroksida (H_2O_2) pada isolat. Berdasarkan hasil pengamatan kelima isolat E33, E79, E95, E102 dan E109 menunjukkan reaksi positif dengan menghasilkan gelembung pada saat diberi larutan hydrogen peroksida (Gambar 14). Hal tersebut menunjukkan bahwa kelima isolat antagonis mampu menghasilkan enzim katalase. Sesuai dengan pernyataan (Yurdakul et al.,

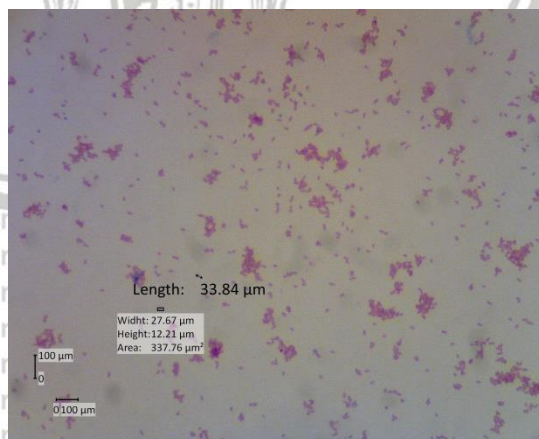
2013) bakteri yang menghasilkan enzim katalase atau bereaksi positif ditandai dengan adanya gelembung pada saat H_2O_2 diteteskan.



Gambar 14. Isolat bakteri bereaksi positif menghasilkan gelembung pada uji katalase

4. Pewarnaan Spora

Pewarnaan spora merupakan uji lanjutan dari uji Gram yang bertujuan untuk mengetahui suatu bakteri menghasilkan spora atau tidak. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kelima isolat tidak menghasilkan warna hijau setelah diberi larutan *malachite green* dan diamati dibawah mikroskop (Gambar 15). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat E33, E79, E95, E102, dan E109 bukan merupakan bakteri yang dapat menghasilkan spora. Muharni *et al.*, (2011) menyatakan bahwa bakteri yang memiliki spora mampu mengikat kuat pewarna yang diberikan (*malachite green*) setelah pencucian dan penetesan larutan safranin dilakukan. Edospora yang terdapat pada sel vegetatif maupun spora bebas akan berwarna biru-kehijauan, sedangkan sel vegetatif sendiri berwarna merah pada saat diamati dibawah mikroskop.

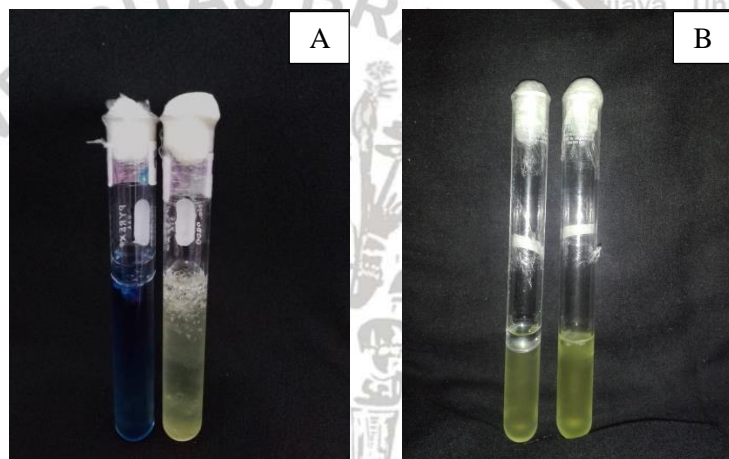


Gambar 15. Hasil pewarnaan spora

5. Uji Oksidatif-Fermentatif

Uji oksidatif-fermentatif dilakukan untuk membedakan bakteri bersifat fermentatif atau oksidatif. Tabung yang diinokulasikan bakteri bersifat

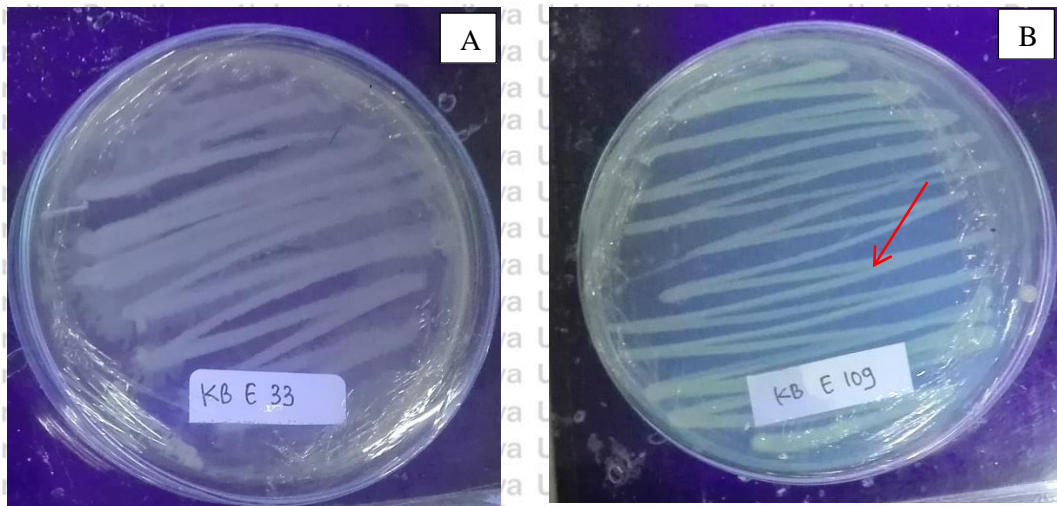
fermentatif apabila kedua tabung berubah warna menjadi kuning. Artinya, bakteri dapat hidup pada kondisi aerob maupun anaerob. Sedangkan bakteri bersifat oksidatif artinya bakteri hanya dapat tumbuh pada kondisi aerob yaitu apabila hanya salah satu tabung yakni tabung yang tidak ditutup parafin berubah warna menjadi kuning. Hasil pengujian menunjukkan bahwa hanya terdapat satu bakteri yakni isolat E79 termasuk bakteri bersifat fermentatif, sedangkan isolat E33, E95, E102 dan E109 termasuk bakteri bersifat oksidatif (Gambar 16). Sesuai dengan pernyataan (Lay, 1994) tabung yang menghasilkan asam akan berubah menjadi warna kuning. Sedangkan tabung yang tidak menghasilkan asam tidak akan mengalami perubahan warna. Hal ini dikarenakan reaksi asam yang dihasilkan dari fermentasi mampu menurunkan pH medium sehingga tabung indikator menjadi berwarna kuning.



Gambar 16. Hasil pengujian OF: (A) Isolat bakteri E109 bersifat oksidatif; (B) Isolat bakteri E79 bersifat fermentatif

6. Uji Pigmen *Fluorescent* pada Media King's B

Pengujian pada media King's B bertujuan untuk mengetahui suatu isolat dapat menghasilkan pigmen *fluorescent* atau tidak. Uji ini dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri pada media Kings B kemudian diberi sinar Ultra Violet (UV). Isolat bakteri E33 dan E79 tidak berpendar pada saat disinari UV, sedangkan isolat E95, E102 dan E109 berpendar pada saat disinari UV. Hal ini membuktikan bahwa isolat E95, E102 dan E109 dapat digolongkan pada genus *Pseudomonas* sp. Nawangsih (2003) juga menyatakan bahwa pigmen *fluorescent* yang dihasilkan suatu bakteri merupakan ciri khas bakteri *Pseudomonas* pada media kadar besi rendah.



Gambar 17. Pigmen *fluorescent* pada isolat bakteri antagonis: (A) Isolat E33 tidak berpendar; (B) Isolat E109 berpendar

7. Uji Pertumbuhan pada media YDC (*Yeast Extra-Dextrose Carbonat*)

Uji pertumbuhan pada YDC merupakan uji lanjutan pada bakteri gram negatif yang dilakukan untuk mengetahui bakteri termasuk dalam genus *Pantoea* sp. atau *Erwinia* sp. Hasil pengujian pada isolat E79 tidak menunjukkan warna kuning pada koloni bakteri yang tumbuh (Gambar 18). Maka dari itu, isolat bakteri E79 termasuk dalam genus *Erwinia* sp. Hal ini sesuai dengan pernyataan Schaad (2001) kelompok bakteri *Pantoea* dan *Erwinia* dapat dibedakan dengan melihat produksi pigmen warna kuning yang dihasilkan oleh bakteri genus *Pantoea* sp. pada media YDC.



Gambar 18. Hasil uji pertumbuhan pada YDC pada isolat E79

4.5.3 Hasil identifikasi Genus Bakteri Antagonis

Berdasarkan pengamatan morfologi dan fisiologi isolat bakteri antagonis terhadap patogen *X. campestris* yang dilakukan dengan metode Schaad (2001)

pada tingkat genus diperoleh hasil seperti pada Tabel 5 berikut.

Tabel 5. Hasil identifikasi bakteri antagonis terhadap patogen *X. campestris*

| Kode Isolat Bakteri | Genus Bakteri |
|---------------------|------------------------|
| E33 | <i>Corynebacterium</i> |
| E79 | <i>Erwinia</i> |
| E95 | <i>Pseudomonas</i> |
| E102 | <i>Pseudomonas</i> |
| E109 | <i>Pseudomonas</i> |

1. *Corynebacterium* sp.

Hasil pengamatan pewarnaan Gram isolat E33 merupakan bakteri Gram positif yang memiliki warna biru keunguan dan menunjukkan reaksi tidak lengket pada pengujian KOH 3%. Pada pengujian endospore tidak menunjukkan adanya endospore. Sedangkan pengujian dengan media oksidatif fermentatif pada tabung reaksi yang tidak ditutup parafin tidak berubah warna menjadi kuning, artinya bakteri hanya dapat tumbuh pada kondisi anaerob. Berdasarkan diagram alur identifikasi Schaad (2001), isolat bakteri E33 termasuk bakteri dari genus *Corynebacterium* sp.

Bakteri *Corynebacterium* sp. memiliki morfologi berwarna putih susu, bentuk koloni bulat, elevasi rata dan bentuk selnya batang. Hal ini sesuai dengan Agrios (2005) *Corynebacterium* merupakan bakteri yang memiliki morfologi bakteri berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, berukuran 0,5-0,9 x 1,5-4 µm, bakteri nonmotil namun beberapa spesies memiliki flagela, termasuk dalam bakteri Gram positif. *Corynebacterium* merupakan bakteri antagonis yang dapat menekan penyakit yang disebabkan oleh cendawan dan bakteri pada tanaman. Menurut Ismail (2011), *Corynebacterium* dapat digunakan dalam penanganan penyakit hawar daun bakteri (HDB) pada beberapa varietas tanaman padi, sehingga dapat menyelamatkan hasil panen hingga 22,2% lebih tinggi. Selain itu menurut Suhandono *et al.*, (2016) *Corynebacterium* merupakan aktinobakteri yang dapat menghasilkan biopestisida alami untuk mengontrol *X. campestris*,

Pseudomonas, *Helminthosporium*, *Cercospora*, *Plasmodiophora brassicae*, dan *Ralstonia solanacearum*.

2. *Erwinia* sp.

Isolat bakteri E79 menunjukkan bakteri Gram negatif yang memiliki warna merah dan menunjukkan reaksi lengket pada pengujian KOH 3%. Pada pengujian katalase menghasilkan gelembung. Sedangkan pengujian dengan media oksidatif fermentatif pada tabung reaksi yang tidak ditutup parafin berubah warna menjadi kuning, artinya bakteri bersifat anaerob. Sedangkan pada pertumbuhan YDC tidak isolat bakteri tidak berwarna kuning. Berdasarkan diagram alur identifikasi Schaad (2001), isolat bakteri E79 termasuk bakteri dari genus *Erwinia* sp. Karakter morfologi bakteri *Erwinia* sp. berwarna putih kekuningan, dengan tepian tidak rata, bentuk sel basil. Sesuai pernyataan Supriadi *et al.*, (2002) bahwa morfologi koloni *Erwinia* sp. berwarna putih kekuningan, mempunyai bentuk koloni bulat dengan tepian tidak rata dan permukaannya cembung. Agrios (2005) juga menyatakan bahwa bentuk sel *Erwinia* sp berbentuk batang dengan ukuran 0,5-1 x 1-3 mikrometer, merupakan bakteri anaerob fakultatif. Menurut penelitian Kempf dan Wolf (1989) menyatakan bahwa *Erwinia herbicola* mampu digunakan sebagai agen antagonis dalam menghambat *E. amylovora* dengan menghasilkan senyawa antibiosis, selain itu bakteri ini juga dapat mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh jamur *Fusarium pulmorum* dan *Puccinia recondita* f.sp *triticii* pada gandum.

3. *Pseudomonas* sp.

Pengamatan pewarnaan Gram isolat E95, E102, dan E109 berwarna merah yang menunjukkan bahwa ketiga isolat termasuk Gram negatif dan menunjukkan reaksi lengket pada pengujian KOH 3%. Pada pengujian endospore tidak menunjukkan adanya endospore. Sedangkan pengujian dengan media oksidatif fermentatif menunjukkan hasil yaitu pada tabung reaksi yang tidak ditutup parafin tidak berubah warna menjadi kuning, artinya bakteri bersifat oksidatif. Selain itu pada uji Kings B ketiga isolat berpendar pada saat disinari UV. Oleh karena itu, ketiga isolat bakteri E33 termasuk bakteri dari genus *Pseudomonas* sp. Bakteri *Pseudomonas* sp. berwarna putih kekuningan, bentuk koloni bulat, tepian rata dan bentuk sel basil. Sesuai pernyataan Agrios (2005) sel bakteri *Pseudomonas*

berbentuk batang lurus hingga melengkung berukuran 0,5-1 x 1,5-4 mikrometer, motil dengan satu atau banyak flagela, pertumbuhan pada media dengan kadar besi rendah beberapa spesies *Pseudomonas* menghasilkan pigmen *fluorecent* yang menyebar.

Bakteri *Pseudomonas* sp. dapat berperan sebagai agen antagonis dalam satu contohnya yaitu bakteri *P. fluorescens*. Menurut penelitian Mishra and Arora (2012) bakteri *P. fluorescens* dapat menghambat patogen *X. campestris* pada kubis dengan zona hambat hingga 1,44 cm. Hanudin (2012) juga menjelaskan bahwa bakteri *P. fluorescens* dapat menginduksi ketahanan tanaman terhadap penyakit dengan cara menginduksi aktivitas enzim fenil dan produksi asam salisilat.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa terdapat bakteri endofit yang diisolasi dari daun tanaman kubis organik yang bersifat antagonis terhadap *X. campestris*. Dari hasil seleksi terdapat lima isolat bakteri yakni E33, E95, E79, E102 dan E109 yang bersifat antagonis mampu menghasilkan zona hambat terhadap patogen *X. campestris*. Kelima isolat bakteri antagonis berpengaruh nyata dalam menghambat *X. campestris* dibandingkan dengan kontrol *streptomycin*. Bakteri antagonis isolat E33 merupakan bakteri genus *Corynebacterium* sp., isolat E79 merupakan bakteri genus *Erwinia* sp., dan isolat E95, E102, E109 merupakan bakteri genus *Pseudomonas* sp. Isolat bakteri genus *Pseudomonas* sp. memiliki daya hambat terbaik dibandingkan dengan isolat lainnya.

5.2 Saran

Penelitian yang dilakukan masih terbatas secara *in vitro* saja, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh penggunaan bakteri endofit antagonis kubis terhadap pengendalian penyakit busuk hitam secara langsung pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik Indonesia. 2018. Statistik tanaman sayuran dan buah-buahan semusim (*statistics of seasonal vegetable and fruit plants*) Indonesia. BPS RI. Jakarta.
- Bila, J., Mondjana, A. M., and Mortensen, C.N. 2009. Recent Outbreaks of Black Rot of Brassicas Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Southern Mozambique. *J. Plant Disease* 93 (11): 12-18.
- Habazar, T., Nasrun, Jamsari, dan Rusli, I. 2007. Pola Penyebaran Penyakit Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas Axonopodis* Pv *Allii*) pada Bawang Merah dan Upaya Pengendaliannya Melalui Imunisasi Menggunakan Rhizobacteria. Dalam Laporan Hasil Penelitian KKP3T. Universitas Andalas Bekerjasama dengan Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta.
- Fahmi, M.F.I., Anto, B., dan S. Agung. 2014. Potensi Rhizobakteri dari Tanaman Kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) Daerah Getasan Semarang Sebagai Agen Biobakterisida Terhadap Patogen *Xanthomonas campestris*. *J. Biologi* 3(3): 53-64.
- Gusnawaty, H.S., Muhammad, T., Leni, T., dan Asniah. 2014. Karakterisasi morfologis *Trichoderma* spp. *indigenus* Sulawesi Tenggara. *J. Agroteknos* 4(2): 88-94.
- Hallman, J., Halmann, A.Q, Miller, W.G., Sikora, R.A., dan Lindow, S.E. 2000. Endophytic Colonization of Plants By The Biocontrol Agent *Rhizobium etli* G12 in Relation to *Meloidogyne incognita* Infection. *J. Phytopathol.* 91(4): 415-422.
- Handoko, A., Abadi, A.L., dan Aini, L.Q. 2014. Karakterisasi Penyakit Penting Pada Pembibitan Tanaman Durian Di Desa Plangkongan, Kabupaten Magetan Dan Pengendalian dengan Bakteri Antagonis Secara in Vitro. *J. HPT* 2(2): 15-22.
- Hanudin dan Marwoto, Budi. 2012. Prospek Penggunaan Mikroba Antagonis Sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit Utama pada Tanaman Hias dan Sayuran. *J. Litbang Pertanian* 31(1).
- Hasani, A., Kariminik, A., dan Issazadeh, S. 2014. *Streptomycetes*: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research.* 2(1): 63-75.
- Hugh, R., dan Leifson, E. 1953. The Taxonomic Significance of Fermentative Verses Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram Negative Bacteria. *J. Bacteriol* 66: 24-26.
- Imani, F., Charina, A., Karyani, T., dan Mukti, G.W. 2018. Penerapan sistem pertanian organik di kelompok Tani Mekar Tani Jaya Desa Cibodas

Kabupaten Bandung Barat. J. Pemikiran Masyarakat Ilmiah Berwawasan Agribisnis 4(2): 139-152.

Ismail, N., Taulu, L.A., dan Bachtiar. 2011. Potensi *Corynebacterium* sebagai Pengendali Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi. Seminar Nasional Serealia. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP). Sulawesi Utara.

Jannah, Raudhatul., Safika., Jalaluddin, M., Darmawi., Farida dan Aliza, Dwinnia. 2017. Jumlah koloni Bakteri Selulolitik pada Sekam Ayam Kampung (*Gallus domesticus*). J. Ilmiah Mahasiswa Veteriner 1(3): 558-565.

Kartikawati, A dan Gusmini. 2018. Potensi Bakteri Endofit yang Diisolasi dari Tanaman Jahe Merah untuk Memacu Pertumbuhan Benih Lada. J. Penelitian Tanaman Rempah dan Obat 29(1): 37-46.

Kawaguchi, A.K., Inove, dan Ichinose, Y. 2008. Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, and Tomato By Nonpathogenic *Agrobacterium vitis* Strain Var 03-1. J. Biological control 96(11): 1218-1225.

Kempf, H.J. dan Wolf, G. 1989. *Erwinia herbicola* as biocontrol agents of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f.sp *triticii* on wheat. J. *Phytopathology*. 79: 990-994

Klement, Z., dan Goodman, R.N. 1967. The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. Annual Review of Phytopathology. 5: 17-44.

Lay. B. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Manajemen PT Grafindo Persada. pp. 129-132. Jakarta.

Lelliot, R. A. dan Stead, D. E. 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. Blackwell Scientific Publication. London.

Lindow, S.E., dan Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. J. Appl Environ Microbiol 69(4): 1875-1883.

Lodewyckx, C.J., Vangronsveld, F., Porteous, E.R.B., Moore, S., Taghavi, Mezgeay, M., dan Lelie, D.V.D. 2002. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. Critical Reviews in Plant Sciences 21:583- 606.

Madigan, M.T dan Martinko, J.M. 2005. Brock Biology of Microorganisms 11th ed. Prentice Hall. New Jersey.

Maji, A., dan Nath, R. 2015. A study on pathological aspects of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of cabbage under red lateritic zone of West Bengal. J. Applied and Natural Science 7(2): 780–785

Mishra, S. and Arora, N. K. 2012. Management of black rot in cabbage by rhizospheric *Pseudomonas* species and analysis of 2,4diacetylphloroglucinol by qRT-PCR. J. Biological Control 61(1): 32-39.

- Mujib, A., Syabana, M., dan Sritamin, M. 2014. Uji Efektifitas larutan pestisida nabati terhadap hama ulat krop (*Crocidolomia pavonana* L.) pada tanaman kubis (*Brassica oleraceae*). J. Ilmu Pertanian dan Perikanan 3(1): 67-72.
- Muharni dan Widjantim, H. 2011. Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) dari Rizosfer Tanaman Karet. J. Penelitian Sains 14(1).
- Nawangsih, A. A., Widjayanti, T., dan Anisa, Y. 2014. Kelimpahan Bakteri Rizosfer pada Sistem PHT-Biointensif serta Kemampuan Antagonismenya Terhadap *Sclerotium rolfsii* pada Kedelai. Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor . J. PHT Tropika 14(20): 110-120
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., dan Hens, L. P. 2016. Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. J. Frontiers in Public Health 4 (1):1-8.
- Nurhidayati, Sri., Faturrahman dan Ghazali, Mursal. 2015. Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi Dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. J. Sains Teknologi dan Lingkungan 1(2).
- Pelczar, M. J dan Chan, E.C.S. 2010. Dasar-dasar Mikroorganisme. Terjemahan dari Elements of Microbiology, oleh Hadjoetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S.L. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pracaya. 2001. Kol alias Kubis Edisi Revisi. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Prataman, R., Yuliani, dan Trimulyono, G. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun dan Biji Jarak (*Jatropha curcas*) sebagai Antibakteri *Xanthomonas campestris* Penyebab Penyakit Busuk Hitam Pada Tanaman Kubis. J. Lentera Bio 4(1): 112-118.
- Pratama, T., Suastika, G., dan Nurmaryah, A. 2017. Dampak penyakit tanaman terhadap pendapatan petani kubis-kubisan di daerah agropolitan Kabupaten Cianjur Jawa Barat. J. Fitopatologi Indonesia 12(6): 218-223.
- Sabdaningsih, A., Budiharjo, A., dan Kusdiyantini, E. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Koloni Bakteri Asosiasi Alga Merah (Rhodophyta) dari Perairan Kutuh Bali. J. Biologi 2(2): 11-17.
- Sallytha, A.A.M., Addy, H.S., Mihardjo, P.A. 2014. Penghambatan Actinomycetes Terhadap *Erwinia carotovora* Subsp. *carotovora* Secara in Vitro. J. Berkala Ilmiah Pertanian 1(4): 70-72.
- Sastrosiswojo, S., Tinny, S.U., dan Rachmat, S. 2005. Penerapan teknologi PHT pada Tanaman Kubis. Balai penelitian Tanaman Sayuran. Bandung.
- Schaad, N. W., Jones, J.B, dan Chon, W. 2001. Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogen Bacteria. Ed ketiga. A press. St. Paul Minnesota.

- Strobel, G. and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products: Microbiology and Molecular Biology Reviews. J. Microbiol 67: 491-502.
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M.K., dan Aditiawati, P. 2016. Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria From Rambutan Fruits (*Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. J. of Biosciences 23: 39-44
- Sudaryanta. 1999. Pertanian Organik Demi Keselamatan dan Kesehatan Bumi Seisinya. Wacana. Jakarta.
- Sunarjono, H. 2011. Bertanam 30 Jenis Sayur. Penebar Swadaya. Jakarta
- Supriadi, N., Ibrahim, dan Taryono. 2002. Karakteristik *Erwinia chrysanthemi* Penyebab Penyakit Busuk Bakteri Pada Daun Lidah Buaya (*Aloe vera*). J. Penelitian Tanaman Industri 8: 2.
- Tasnim, S, K. Retno, dan N.P.A. Astiti. 2011. Efektifitas daya hambat bakteri *Streptomyces* sp. terhadap *Erwinia* sp. penyebab penyakit busuk rebah pada tanaman lidah buaya (*Aloe Barbadensis* Mill). J. Simbiosis I: 21-27.
- Triana, O., Ria, P., dan Mulyani, N.S. 2017. Isolasi Bakteri Endofit pada Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Linn. var Rubrum) Penghasil Senyawa Antioksidan. J. Kimia Sains dan Aplikasi 20(1): 25-29
- Trisia, A., R. Philyria, dan A.N. Toemon. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstraks Etanol Daun Kalanduyung (*Gauzuma ulmifolia* Lam.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer). J. Anterior 17(2): 136-143
- Utama, C. dan Mulyanto, A. 2009. Potensi limbah pasar sayur menjadi starter fermentasi. J. Kesehatan (Bandar Lampung) 2(1):6-13
- Vidyani F. 2013. Identifikasi penyakit tanaman kubis menggunakan *gaussian filter* dan *wavelet transformation*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Wati, F.D.A., Suhartiningsih, D.N., Hardian, S.A. 2017. Eksplorasi *Bacillus spp.*, dari Perakaran Kubis Sebagai Agen Antagonis *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. J. Agritop 15(2): 217-225
- Wick, R. 2010. Tobacco Hypersensitivity. The First Test to Screen Bacteria for Pathogenecity. J. NPDN News 5(7): 3-4.
- Wuryandari, Y., Purnawati, A., Arwiyanto, T., dan Hadisutrisno, B. 2008. Dose and Dilution of Effectiveness of Fluorescents in Tomato against *Ralstonia solanacearum* In Vitro. J. Maperta 10(2): 72-78
- Xia, Ye., Seth, D., Dreyer, J., Scott, D., dan William, A.M. 2015. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic conventional practices. J. Frontiers in Plant Science 6(400): 1-10

Yanti, Y., Rifai, I., Pratama, Y. A., and Harahap, M. I. 2019. Penapisan isolat rizobakteri *indigenus* untuk pengendalian (*Ganoderma boninense*) di pre nursery kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). J. Agro 6 (2):111-122.

Yulianti, T. 2013. Pemanfaatan endofit sebagai agensia pengendali hayati hama dan penyakit tanaman. J. Article. 5(1): 40-49.

Yurdakul, N.E., Erginkaya, Z., dan Unal, E. 2013. Antibiotic resistance of Enterococci, Coagulase Negative *Staphylococci* and *Staphylococcus aerus* Isolated from Chicken Meat. Czech J. Food Sci. 31(1): 14-19.

Zulkarnain. 2013. Budidaya sayuran tropis. Bumi Aksara. Jakarta.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Lahan pengambilan sampel tanaman kubis di ATP Universitas Brawijaya



Lampiran 2. Analisis ragam rerata penghambatan bakteri endofit antagonis terhadap patogen *X. campestris*

1. Analisis ragam rerata penghambatan bakteri endofit antagonis terhadap patogen

X. campestris pada 24 JSI

| SK | DB | JK | KT | F. Hitung | F. Tabel 5% |
|-----------|----|--------|-------|-----------|-------------|
| Perlakuan | 5 | 13.633 | 2.727 | 30.145 | 2.77 |
| Galat | 18 | 1.628 | 0.090 | | |
| Total | 23 | 15.262 | | | |

2. Analisis ragam rerata penghambatan bakteri endofit antagonis terhadap patogen

X. campestris pada 48 JSI

| SK | DB | JK | KT | F. Hitung | F. Tabel 5% |
|-----------|----|--------|-------|-----------|-------------|
| Perlakuan | 5 | 16.306 | 3.261 | 41.376 | 2.77 |
| Galat | 18 | 1.419 | 0.079 | | |
| Total | 23 | 17.725 | | | |

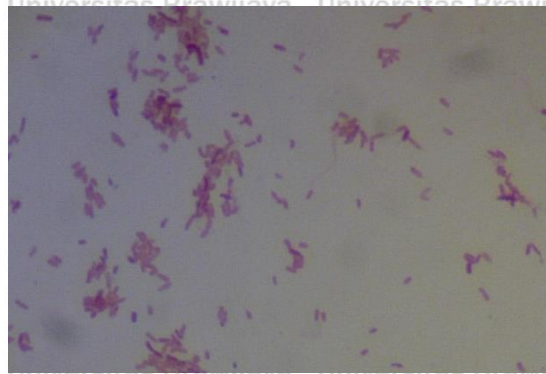
3. Analisis ragam rerata penghambatan bakteri endofit antagonis terhadap patogen

X. campestris pada 72 JSI

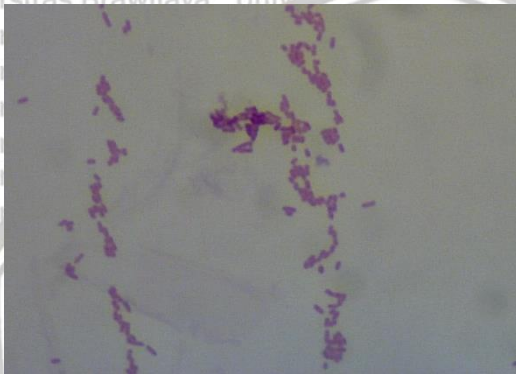
| SK | DB | JK | KT | F. Hitung | F. Tabel 5% |
|-----------|----|--------|-------|-----------|-------------|
| Perlakuan | 5 | 15.906 | 3.181 | 48.758 | 2.77 |
| Galat | 18 | 1.174 | 0.065 | | |
| Total | 23 | 17.080 | | | |

Lampiran 3. Karakterisasi isolat bakteri endofit antagonis**1. Dokumentasi pewarnaan Gram**

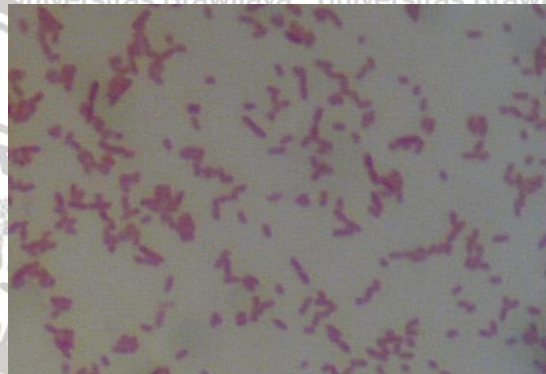
Isolat E33



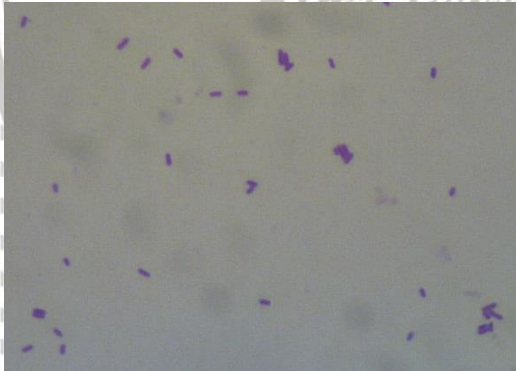
Isolat E79



Isolat E95

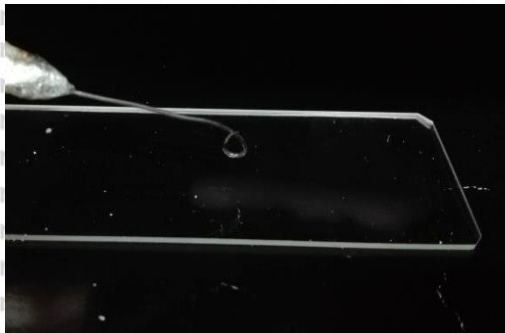


Isolat E102

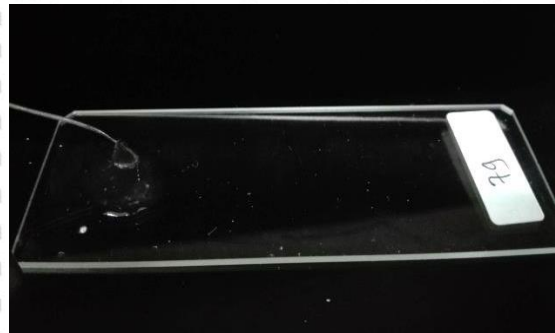


Isolat E109

2. Dokumentasi Uji KOH



Isolat E33



Isolat E79



Isolat E95

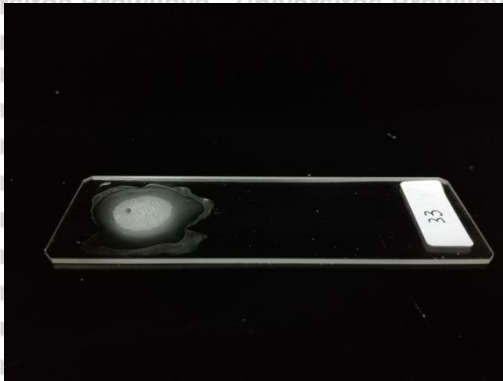


Isolat E102



Isolat E109

3. Uji Katalase isolat bakteri antagonis



Isolat E33



Isolat E79



Isolat E95



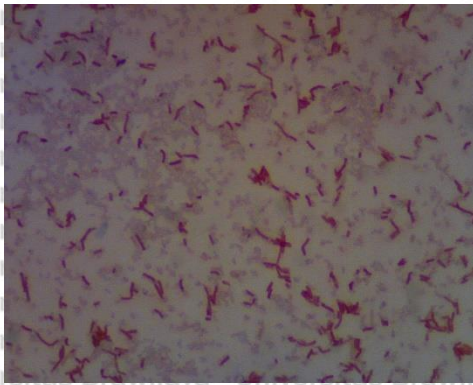
Isolat E102



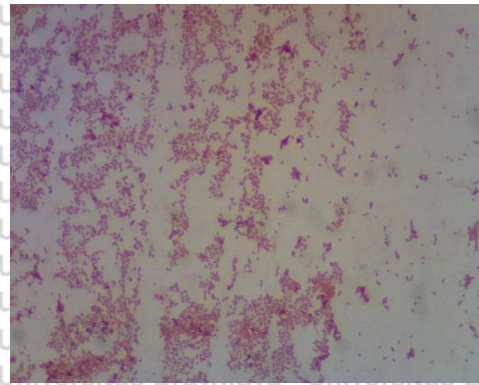
Isolat E109



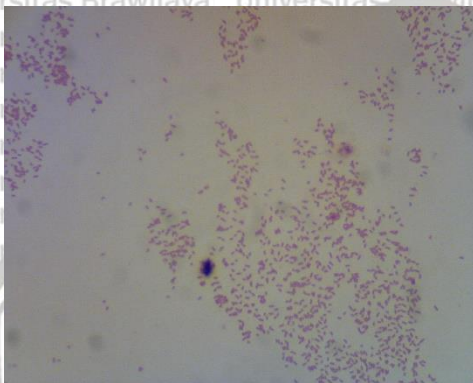
3. Dokumentasi Pewarnaan Endospora



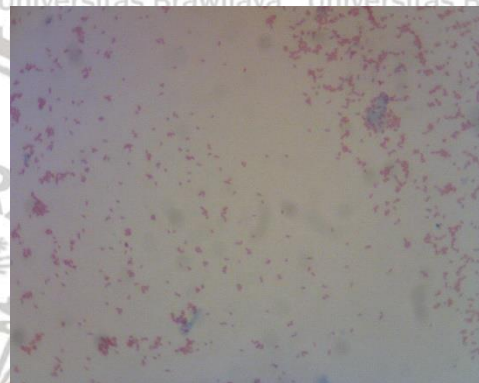
Isolat E33



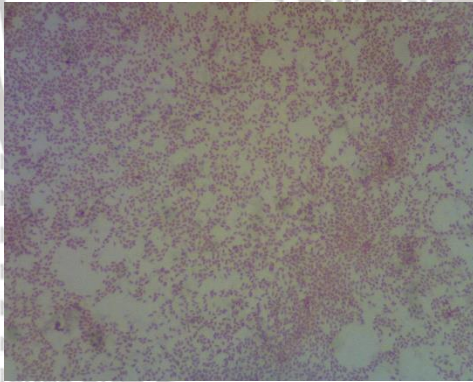
Isolat E79



Isolat E95



Isolat E102



Isolat E109



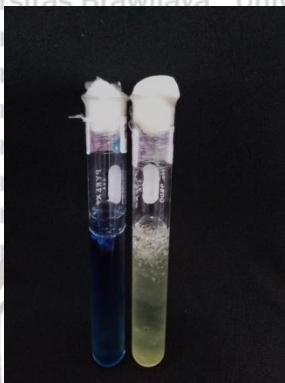
4. Dokumentasi Uji Oksidatif-Fermentatif



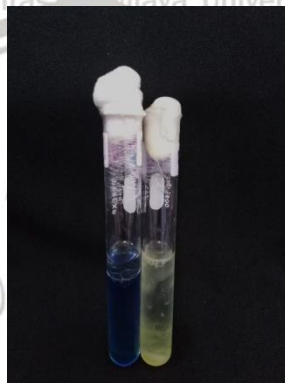
Isolat E33



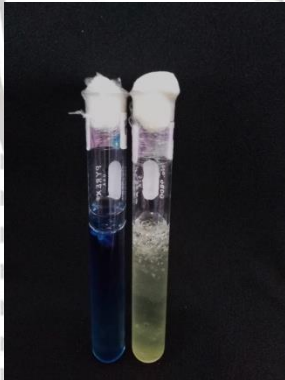
Isolat E33



Isolat E95



Isolat E102

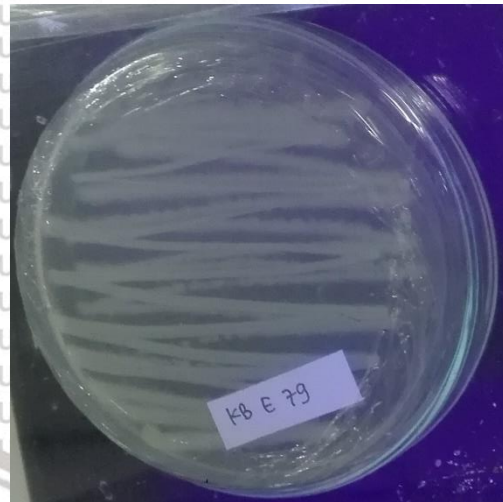


Isolat E109

5. Uji pada media King's B



Isolat E33



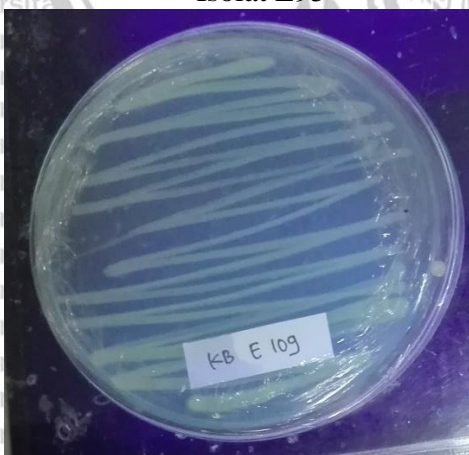
Isolat E79



Isolat E95



Isolat E102



Isolat E109