

# Potensi Rizobakteri Pembentuk Endospora dari Brokoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) sebagai Agen Biokontrol *Ralstonia solanacearum* serta Biofertilizer

Muhammad Faishal Fauzaan<sup>1</sup>, Wijanarka<sup>1</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>1</sup>, Anto Budiharjo<sup>2</sup>,  
Rejeki Siti Ferniah<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang

<sup>2</sup>Laboratorium *Molecular and Applied Microbiology*, Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang

Penulis Korespondensi: [ferniahmikro@gmail.com](mailto:ferniahmikro@gmail.com)

## Abstract

Bacterial wilt is a soil-borne disease caused by *Ralstonia solanacearum*, which widely attacks horticulture plants. Soil bacterial communities that inhabit the rhizosphere area are known to have good potential to stimulate plant growth and also protect it from pathogens. Endospore-forming bacteria were chosen because they have a pretty good tolerance when faced with an unsuitable environment for their growth. This research aims to isolate and determine the most potential endospore-forming rhizobacteria isolate as a biocontrol agent against *R. solanacearum* from healthy broccoli rhizosphere in organic agriculture in Kopeng village Semarang regency and also to find out its biofertilizer properties. Endospore-forming rhizobacteria isolation by spread plate method; isolate purification by streak plate method, isolate characterization by Gram and endospore staining; Kirby-Bauer antibacterial susceptibility test against *R. solanacearum*; molecular identification by 16S rRNA genes; phylogenetic tree construction and biofertilizer properties characterization such as IAA production using Salkowski reagent, phosphate solubilizing using Pikovskaya media and nitrogen-fixing using Nitrogen-free Bromothymol-blue media. Results showed that 18 isolates of endospore-forming rhizobacteria had been isolated with two potential isolates against phytopathogen, namely RB5 and RB14; RB5 had moderate antimicrobial activity showed by 6 mm of inhibition zone and has been identified as *Bacillus subtilis* with 98.10% similarities and also had capabilities to produces IAA and solubilizes phosphate, but unable to fixes nitrogen.

**Keywords:** *Biocontrol, Biofertilizer, Endospore, Ralstonia solanacearum, Rhizosphere of Broccoli*

## Abstrak

Penyakit Layu Bakteri merupakan penyakit tular tanah yang menyerang tanaman hortikultura yang disebabkan oleh bakteri fitopatogen *Ralstonia solanacearum*. Komunitas bakteri tanah yang menghuni rizosfer tanaman diketahui memiliki potensi yang baik dalam mendukung pertumbuhan maupun melindungi tanaman dari serangan patogen. Bakteri pembentuk endospora dipilih karena memiliki toleransi yang cukup bagus apabila dihadapkan dengan lingkungan yang tidak cocok bagi pertumbuhannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi isolat rizobakteri pembentuk endospora potensial sebagai agen biokontrol melawan *R. solanacearum* dari rizosfer brokoli sehat di lahan pertanian organik desa Kopeng Kabupaten Semarang serta mengetahui potensinya sebagai agen biofertilizer. Isolasi rizobakteri pembentuk endospora menggunakan metode *spread plate*; purifikasi isolat rizobakteri menggunakan metode *streak plate*, karakterisasi dengan uji pewarnaan Gram dan uji pewarnaan endospora, uji antibakteri melawan *R. solanacearum* menggunakan metode Kirby-Bauer; identifikasi molekuler dengan gen 16S rRNA; konstruksi pohon filogenetik dan uji potensi biofertilizer berupa uji produksi IAA menggunakan reagen Salkowski, uji pelarutan fosfat menggunakan media Pikovskaya dan uji fiksasi nitrogen menggunakan media *Nitrogen-free Bromothymol-blue*. Hasil penelitian diperoleh 18 isolat rizobakteri pembentuk endospora dengan 2 isolat potensial dalam melawan fitopatogen, yaitu isolat RB5 dan RB14; isolat RB5 memiliki potensi antibakteri paling besar dengan daya hambat kategori sedang (6 mm) dan teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis* dengan nilai similaritas sebesar 98,10% serta mampu memproduksi IAA dan melarutkan fosfat tetapi tidak mampu memfiksasi nitrogen secara kualitatif.

**Kata Kunci:** *Biofertilizer, Biokontrol, Endospora, Ralstonia solanacearum, Rizosfer Brokoli*

## PENDAHULUAN

Eksplorasi mikroorganisme dalam bidang pertanian merupakan strategi sumber daya berkelanjutan dengan menemukan serta memanfaatkan mikroorganisme yang memiliki

potensi tertentu untuk meningkatkan produktivitas komoditas pertanian. Berdasarkan pada Mangungsong *et al.* (2019), pemanfaatan mikroorganisme dalam pertanian mampu meningkatkan ketersediaan unsur hara tanah dan penyerapan oleh tanaman. Namun, efisiensi

pengaplikasian mikroorganisme potensial masih mengalami kendala akibat kemampuan penyesuaian mikroorganisme terhadap faktor lingkungan yang tidak terkendali. Oleh karena itu, mikroorganisme yang mampu membentuk endospora dipilih karena memiliki toleransi yang cukup bagus apabila dihadapkan dengan lingkungan yang tidak cocok bagi pertumbuhannya. Hal tersebut sesuai dengan Sumarno *et al.* (2014), bakteri pembentuk endospora lebih stabil dan tahan dalam kondisi yang tidak menguntungkan.

Bakteri pembentuk endospora memiliki rentang penyebaran yang luas karena mampu beradaptasi dengan baik di berbagai lingkungan. Berdasarkan pada Wunderlin *et al.* (2016), bakteri pembentuk endospora dilaporkan dapat diisolasi dari berbagai macam lingkungan, seperti pada tanah, air, sedimen, udara, es, serta dari usus manusia dan hewan. Nicholson *et al.* (2000) berpendapat bahwa bakteri pembentuk endospora dapat ditemukan di semua tempat, di atas maupun di bawah permukaan tanah.

Rizosfer adalah lapisan tanah yang mengelilingi akar tanaman sebagai tempat tumbuh bagi bakteri yang memainkan peran penting dalam mendukung pertumbuhan tanaman. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) merupakan sekelompok bakteri tanah yang memiliki potensi dalam mendukung pertumbuhan suatu tanaman, bahkan dapat dimanfaatkan dalam melawan mikroorganisme yang bersifat patogen bagi tanaman.

Pelaksanaan pertanian tanaman hortikultura sejauh ini menghadapi beberapa kendala, salah satunya adalah serangan penyakit layu bakteri (*Bacterial Wilt Disease*). Berdasarkan pada Ahmed *et al.* (2022), penyakit layu bakteri merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi fitopatogen tular tanah, yaitu *Ralstonia solanacearum* yang menyerang famili Solanaceae, seperti tomat, kentang, paprika, jahe dan terung serta non solanaceae, seperti pisang dan kacang tanah. Berdasarkan pada Verma *et al.* (2014), Bakteri ini biasanya menginfeksi tanaman melalui luka dan mengolonisasi korteks hingga xylem dan akhirnya menyebar ke seluruh tubuh tanaman. Selama infeksi, semua daun mulai layu dengan cepat dan mengering, meskipun daun masih berwarna hijau.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Wulansari *et al.* (2015) ditemukan bakteri *Bacillus* sp. dari rizosfer tanaman brokoli yang diisolasi di Tabanan, Bali yang memiliki potensi dalam melawan fitopatogen brokoli. Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan oleh Lemessa & Zeller (2007), *Bacillus subtilis* mampu

membentuk zona hambat sebesar 10 mm terhadap *R. solanacearum*. Berdasarkan Rahman *et al.* (2016), bakteri *Bacillus* spp. mampu membentuk endospora. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* pembentuk endospora memiliki potensi dalam melawan fitopatogen *R. solanacearum*.

Bakteri genus *Bacillus* telah banyak diteliti dan dapat dimanfaatkan sebagai agen PGPR. Berdasarkan pada Vásconez *et al.* (2020), bakteri yang berasosiasi dengan rizosfer tanaman memiliki beberapa kemampuan dalam membantu pertumbuhan tanaman, seperti dalam memproduksi fitohormon, berperan dalam siklus biogeokimia dan sebagai agen biokontrol dalam melawan fitopatogen. Berdasarkan pada Tejera *et al.* (2013) dalam Vásconez *et al.* (2020), bakteri *B. subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus pumilus* digunakan dalam melarutkan fosfat, memproduksi hormon, memfiksasi nitrogen dan memiliki sifat antagonisme dalam melawan patogen.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi isolat rizobakteri pembentuk endospora potensial sebagai agen biokontrol melawan *R. solanacearum* dari rizosfer brokoli sehat di lahan pertanian organik desa Kopeng Kabupaten Semarang serta mengetahui potensinya sebagai agen biofertilizer dalam memproduksi *Indole-3-Acetic Acid* (IAA), melarutkan fosfat dan memfiksasi nitrogen.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan. Pengambilan sampel tanah dilakukan di lahan pertanian organik desa Kopeng kabupaten Semarang dan penelitian lebih lanjut dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro.

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu timbangan analitik, *cool box*, *soil tester*, termometer, gelas erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, penangas air, *rotary shaker*, mikropipet, tip mikropipet, tabung reaksi, cawan petri, autoklaf, *Laminaf Air Flow* (LAF), lampu spiritus, *spreader*, inkubator, jarum ose bulat, vortex, rak tabung reaksi, *microwave*, kertas cakram 6 mm, jangka sorong, gelas benda, mikroskop binokuler, sentrifus, *thermal cycler*, nano drop, perangkat elektroforesis, *gel documentation*, *cotton swab* dan tabung *falcon*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu alkohol 70%, akuades, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), isolat bakteri fitopatogen *Ralstonia solanacearum* yang didapatkan dari Fakultas Pertanian Universitas Padjajaran, sampel tanah rizosfer brokoli yang diperoleh dari lahan pertanian organik Desa Kopeng, *Malachite Green*, kertas saring, kertas cakram, antibiotik ampicilin, kristal violet, iodium, *decolorizer*, safranin, minyak imersi, NaCl, larutan 0,5 McFarland, ddH<sub>2</sub>O, kit InstaGene™ Matrix BioRad, primer 1492R, primer 27F, My TAQ Hs Red DNA, agarosa 1%, bufer TAE 1X, *DNA ladder*, *loading dye*, *aluminium foil*, triptofan 0,1%, reagen Salkowski, media agar Pikovskaya dan media *Nitrogen-free Bromothymol-Blue* (NfB).

## Cara Kerja

### a. Pengambilan Sampel Tanah Rizosfer Brokoli

Pengambilan sampel tanah rizosfer tanaman brokoli diambil di lahan pertanian organik Kelompok Tani Citra Muda desa Kopeng kabupaten Semarang. Mikroklimat tanah rizosfer brokoli sehat diukur untuk menentukan nilai pH, suhu dan kelembapan tanah. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan metode acak sederhana dengan memilih 3 tanaman brokoli sehat dari 3 petak berbeda. Masing-masing tanah sebanyak 100 g pada kedalaman 0-10 cm diambil kemudian dikompositkan menjadi satu.

### b. Isolasi Bakteri Pembentuk Endospora

Bakteri pembentuk endospora diisolasi dengan perlakuan pemanasan 80°C (Sumarno *et al.*, 2014). Tanah rizosfer sebanyak 10 g dicampurkan dengan akuades steril sebanyak 90 mL ke dalam gelas erlenmeyer. Campuran dihomogenkan menggunakan *rotary shaker* selama 30 menit dengan kecepatan 200 rpm. Larutan homogen dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit. Larutan diencerkan secara bertingkat dengan perbandingan 1:9 menggunakan akuades steril. Masing-masing hasil pengenceran ditumbuhkan pada media NA menggunakan metode *spread plate* dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Purifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan metode *streak plate*.

Uji pembentukan endospora dilakukan menggunakan metode Schaeffer-Fulton dengan ditetaskan zat warna *Malachite Green* selama 5 menit di atas air mendidih dan zat warna Safranin selama 1 menit. Tahap pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan kelompok Gram rizobakteri dengan menggunakan Kristal Violet, Iodium,

*decolorizer* dan Safranin. Isolat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x pada minyak imersi.

### c. Uji Antibakteri Melawan *Ralstonia solanacearum*

Metode Kirby-Bauer digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri isolat dengan menggunakan kertas cakram (Sumarno *et al.*, 2014). Isolat rizobakteri pembentuk endospora dan *R. solanacearum* ditumbuhkan pada 5 ml media NB selama 24 jam dalam *rotary shaker* bersuhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm. Kultur cair *R. solanacearum* digoreskan di atas media NA menggunakan *cotton swab*. Kultur cair masing-masing isolat rizobakteri sebanyak 10 µL ditetaskan pada kertas cakram dalam medium yang sama dengan bakteri uji. Kedua isolat tersebut diinkubasi bersama-sama dengan suhu ruang selama 48 jam. Akuades steril digunakan sebagai kontrol negatif dan antibiotik ampicilin digunakan sebagai kontrol positif. Zona hambat yang terbentuk diukur untuk menentukan isolat potensial dengan zona hambat paling besar.

### d. Identifikasi Molekuler Isolat Rizobakteri Potensial

Koloni isolat murni rizobakteri potensial sebanyak 1 ose diinokulasikan ke dalam 5 mL NB dan diinkubasi dalam *rotary shaker* selama 18 jam pada suhu 37°C. Ekstraksi DNA rizobakteri potensial dilakukan menggunakan kit InstaGene™ Matrix BioRad.

Amplifikasi DNA rizobakteri potensial menggunakan kit MyTaq™ HS Red Mix. Markah genetik yang digunakan adalah sekuens gen 16S rRNA menggunakan primer 27F dan primer 1492R untuk mendapatkan panjang sekuens sekitar 1.550 bp. Larutan DNA diamplifikasi sebanyak 35 siklus dengan tahap denaturasi awal selama 3 menit pada suhu 95°C, tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, tahap annealing pada suhu 54°C selama 1 menit, tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik dan tahap ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Visualisasi DNA rizobakteri potensial dilakukan menggunakan metode analisis gel elektroforesis. Analisis sekuens dilakukan dengan bantuan perangkat lunak MEGA X untuk mengetahui hubungan kekerabatan isolat rizobakteri potensial dengan mikroorganisme lain. Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000 replikasi.

### e. Uji Potensi Biofertilizer Isolat Rizobakteri Potensial

### Uji Produksi Indole-3-Acetic Acid (IAA)

Isolat rizobakteri potensial ditumbuhkan dalam medium NB sebanyak 5 mL yang disuplementasi dengan triptofan 0,1% pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 48 jam pada 37°C dalam keadaan gelap. Pelet dan supernatan isolat dipisahkan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan 2 mL reagen Salkowski. Biakan diinkubasi selama 20 menit bersuhu ruangan dalam keadaan gelap. Perubahan warna diamati untuk mengetahui reaksi produksi senyawa IAA. Perubahan warna menjadi merah muda menunjukkan adanya produksi IAA.

### Uji Pelarutan Fosfat

Isolat murni rizobakteri potensial diinokulasikan pada medium NB sebanyak 5 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C. Biakan diinokulasikan pada media agar Pikovskaya. Biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas pelarutan fosfat.

### Uji Fiksasi Nitrogen

Isolat murni rizobakteri potensial diinokulasikan pada medium semi-solid *Nitrogen Free Bromthymol-Blue* (NFB) sebanyak 5 mL dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama selama 7 hari pada suhu ruang. Hasil positif diamati secara kualitatif ditandai dengan perubahan warna media menjadi biru.

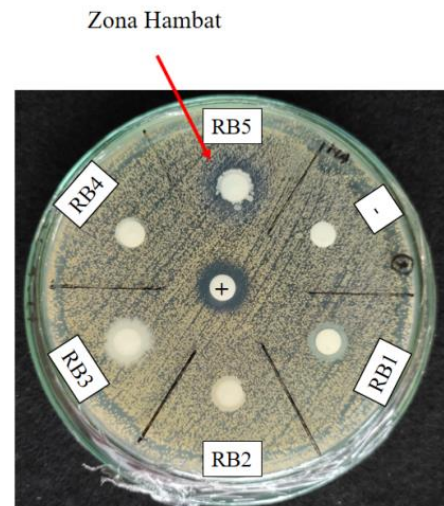
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Isolasi Rizobakteri Pembentuk Endospora

Bakteri pembentuk endospora dapat lebih adaptif di suhu lingkungan yang lebih tinggi daripada bakteri mesofil yang tidak mampu membentuk endospora. Berdasarkan pada Carroll *et al.* (2016), resistensi panas pada spora sebagian disebabkan oleh kondisi terdehidrasi dan terdapat sejumlah besar kalsium dipikolinat. Delapan belas isolat murni rizobakteri telah didapatkan pada media NA setelah dilakukan pengenceran bertingkat. Hasil pewarnaan Gram rizobakteri menunjukkan semua isolat termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram positif. Hasil pewarnaan endospora menunjukkan semua isolat terkonfirmasi memiliki struktur endospora. Hasil pengamatan mikroskopis rizobakteri pembentuk endospora dapat dilihat pada Tabel 1.

### 2. Aktivitas Antibakteri Isolat Rizobakteri Melawan Fitopatogen *Ralstonia solanacearum*

Hasil uji antibakteri isolat rizobakteri pembentuk endospora paling potensial dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan pada hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri isolat rizobakteri potensial melawan fitopatogen *R. solanacearum* selama 48 jam menunjukkan pembentukan zona hambat pada 2 isolat dari 18 isolat rizobakteri potensial. Dua isolat rizobakteri potensial tersebut secara berturut-turut, yaitu pada isolat RB5 dan RB14. Pembentukan zona hambat terjadi akibat adanya pelepasan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh rizobakteri potensial yang dapat menghambat pertumbuhan fitopatogen.



Gambar 1. Zona hambat uji antibakteri isolat rizobakteri pembentuk endospora paling potensial.

Isolat RB5 menunjukkan pembentukan zona hambat paling baik sebesar 6 mm sehingga termasuk ke dalam kategori daya hambat sedang, sedangkan isolat RB14 hanya menunjukkan pembentukan zona hambat sebesar 4,1 mm sehingga termasuk ke dalam kategori daya hambat lemah. Berdasarkan pada Davis & Stout (1971) dalam Sumarno *et al.* (2014), bahwa diameter zona hambat kurang atau sama dengan 5 mm dapat dikategorikan memiliki daya hambat lemah, diameter zona hambat sebesar 5-10 mm dapat dikategorikan memiliki daya hambat sedang.

Penelitian yang dilakukan oleh Hasinu *et al.* (2021) dengan melakukan uji antibakteri dari *Bacillus subtilis* terhadap *R. solanacearum* yang menyerang tanaman pisang di Ambon menunjukkan pembentukan zona hambat sebesar

7,5 mm. Penelitian serupa juga telah dilakukan oleh Tuhumury *et al.* (2021) dengan melakukan uji antibakteri dari *Bacillus niabensis* dan *B. subtilis* terhadap *R. solanacearum* yang menyerang tanaman tomat di Waimital menunjukkan pembentukan zona hambat sebesar 4 mm.

### 3. Identifikasi Molekuler Isolat Rizobakteri Potensial

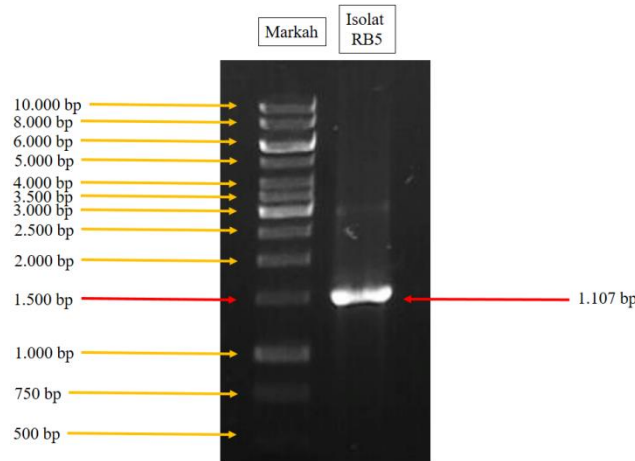
Berdasarkan hasil visualisasi, didapatkan pita DNA penyandi gen 16S rRNA isolat RB5 yang berhasil teramplifikasi pada kolom markah DNA dengan ukuran  $\pm 1.500$  bp. Berdasarkan pada Noer (2021), gen penyandi 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1.550 bp. Gen 16S rRNA bersifat universal dalam tahap identifikasi bakteri. Hasil sekuens DNA penyandi gen 16S rRNA isolat RB5 yang

teramplifikasi dapat dilihat pada Gambar 2. Sekuens DNA isolat RB5 yang diperoleh dilakukan penyuntingan menggunakan *software* BioEdit untuk mengeliminasi sekuens yang tidak bagus.

Berdasarkan pada hasil BLAST, isolat RB5 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan bakteri spesies *Bacillus subtilis* strain FP.PT.1.1-CTCRI (Nomor Asesi MT068199.1) dengan persentase similaritas sebesar 98,10%. Berdasarkan pada Akihary & Kolondam (2020), nilai persentase similaritas sekuens 16S rRNA kurang dari 97,5% dapat dikatakan sebagai spesies berbeda. Isolat RB5 teridentifikasi sebagai bakteri spesies *Bacillus subtilis* berdasarkan pada sekuens 16S rRNA.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Mikroskopis Rizobakteri Pembentuk Endospora

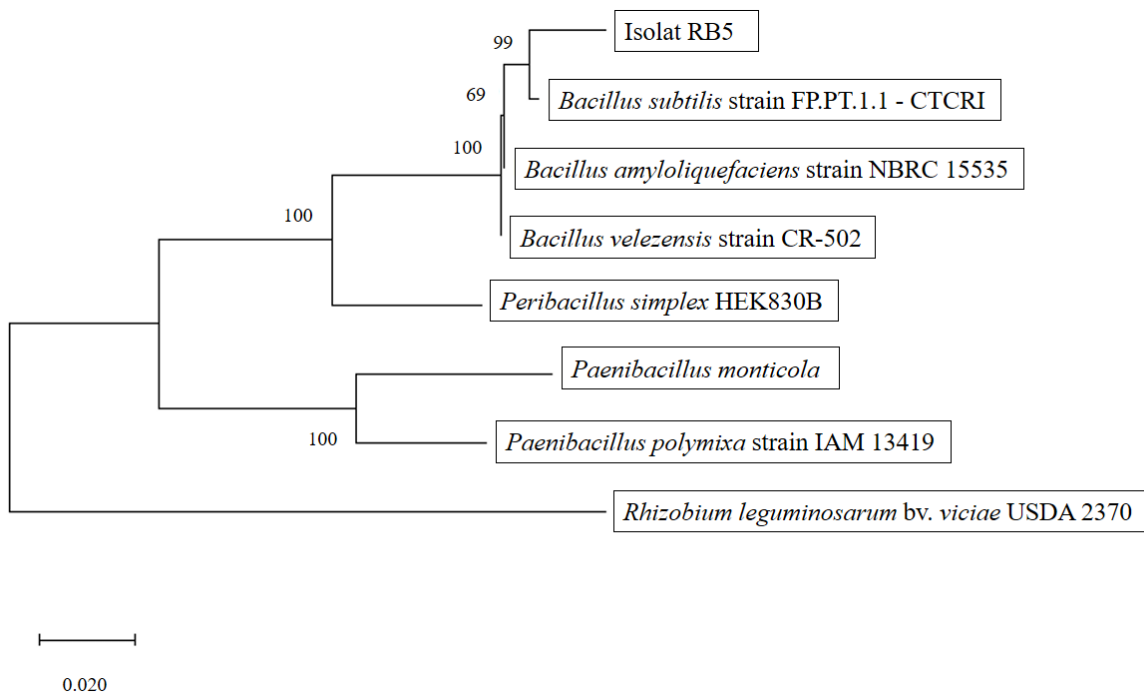
Kode Isolat	Bentuk Endospora	Letak Endospora	Gram	Warna Sel	Bentuk Sel
RB1	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil
RB2	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB3	<i>Elliptical</i>	<i>Subterminal</i>	+	Ungu	Basil
RB4	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB5	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil
RB6	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil
RB7	<i>Spherical</i>	<i>Terminal</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB8	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil
RB9	<i>Spherical</i>	<i>Terminal</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB10	<i>Spherical</i>	<i>Terminal</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB11	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB12	<i>Spherical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Diplobasil
RB13	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil
RB14	<i>Elliptical</i>	<i>Terminal</i>	+	Ungu	Basil
RB15	<i>Elliptical</i>	<i>Terminal</i>	+	Ungu	Basil
RB16	<i>Elliptical</i>	<i>Terminal</i>	+	Ungu	Basil
RB17	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil
RB18	<i>Elliptical</i>	<i>Central</i>	+	Ungu	Basil



Gambar 2. Sekuens DNA penyandi gen 16S rRNA isolat RB5 yang teramplifikasi.

Berdasarkan pada Roy *et al.* (2014), filogenetik merupakan studi yang mempelajari hubungan kekerabatan evolusioner antarkelompok organisme.

Hasil analisis pohon filogenetik isolat RB5 dengan beberapa mikroorganisme pembanding dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pohon filogenetik isolat RB5 dengan beberapa mikroorganisme lain.

Berdasarkan pada hasil analisis filogenetik tersebut, isolat RB5 memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan *Bacillus subtilis* strain FP.PT.1.1-CTCRI ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebesar 99%. Berdasarkan pada Ihsan *et al.* (2020), nilai *bootstrap* yang tinggi di atas 70% mengindikasikan pohon filogenetik yang baik. Berdasarkan hal tersebut, hasil analisis pohon filogenetik sejalan dengan hasil penyejajaran BLAST dengan menyatakan bahwa isolat RB5 teridentifikasi sebagai bakteri spesies *Bacillus subtilis*. Bakteri *B. subtilis* termasuk ke dalam

kelompok bakteri Gram positif. Berdasarkan hasil penelitian ini, *B. subtilis* memiliki potensi penghambatan kategori sedang sebesar 6 mm melawan fitopatogen *Ralstonia solanacearum*.

Berdasarkan pada Istiqomah & Kusumawati (2018), isolat *B. subtilis* UB-ABS2 dan *B. subtilis* UB-ABS6 menghasilkan kemampuan pembentukan daya hambat terhadap *R. solanacearum* secara berurutan sebesar 21,25 mm dan 23,12 mm. Mekanisme antibiosis bersifat bakteriostatik karena memberikan efek



penghambatan dan tidak membunuh bakteri patogen secara keseluruhan.

#### 4. Potensi Isolat Rizobakteri Potensial sebagai Biofertilizer

Isolat RB5 mampu memproduksi IAA melalui media NB yang disuplementasi oleh L-triptofan 0,1%. Berdasarkan pada Herlina *et al* (2016), hormon *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) merupakan hormon auksin alami tanaman yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Penambahan L-triptofan berfungsi sebagai prekursor pembentukan IAA. Hal tersebut sesuai dengan Naveed *et al* (2015), L-triptofan merupakan prekursor auksin yang efisien. Berdasarkan pada Gang *et al.* (2019), reagen salkowski merupakan campuran dari 0,5 M besi klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) dan 35% asam perklorat ( $\text{HClO}_4$ ) yang akan bereaksi dengan IAA menjadi berwarna merah muda yang disebabkan oleh adanya pembentukan kompleks IAA dan reduksi ion  $\text{Fe}^{3+}$ . Berdasarkan pada Ahmad *et al.* (2017), *B. subtilis* yang diisolasi dari tanaman *rapeseed* di mampu memproduksi senyawa IAA.

Isolat RB5 mampu melarutkan fosfat pada media agar Pikovskaya ditandai dengan terbentuknya zona bening setelah 7 hari inkubasi. Media agar Pikovskaya menggunakan senyawa  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sebagai sumber fosfat. Berdasarkan pada Wan *et al* (2020), fosfor merupakan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhan tanaman yang terlibat dalam jalur metabolisme penting seperti penyerapan nutrisi, oksidasi biologis dan metabolisme energi. Terdapat sedikit proporsi dari unsur fosfor yang tersedia dalam tanah bagi pertumbuhan tanaman. Sebagian besar unsur fosfor tanah dalam bentuk senyawa anorganik tak larut seperti  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Senyawa fosfor anorganik tak larut seperti kalsium fosfat membutuhkan mikroorganisme pelarut fosfat untuk mengubahnya menjadi senyawa yang dapat diserap oleh tanaman seperti  $\text{PO}_4^{3-}$ . Senyawa tersebut dapat dilarutkan dengan produksi dan pelepasan asam-asam organik seperti asam sitrat dan asam glukonat oleh bakteri pelarut fosfat. Berdasarkan pada Maheswar & Sathiyavani (2012), *B. subtilis* yang diisolasi dari rizosfer kacang tanah di India memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat.

Isolat RB5 tidak mampu memfiksasi nitrogen bebas pada media *Nitrogen-free Bromthymol Blue* (NfB) karena tidak dapat mengubah warna media menjadi berwarna biru. Berdasarkan pada Goswami *et al.* (2015), isolat bakteri yang mampu memfiksasi nitrogen dalam medium NfB ditunjukkan dengan terjadinya akumulasi pH yang tinggi setelah inokulasi pada medium. Akumulasi pH yang tinggi dalam medium tersebut

diindikasikan dengan terjadinya perubahan warna medium menjadi berwarna biru. Hal tersebut disebabkan karena medium NfB mengandung zat warna *bromothymol blue* yang sensitif akan pH. Akumulasi pH yang tinggi disebabkan oleh aktivitas metabolisme isolat akibat terjadinya proses fiksasi nitrogen dengan mengubah  $\text{N}_2$  bebas menjadi  $\text{NH}_3$ . Nitrogen bebas yang telah terfiksasi oleh bakteri pemfiksasi nitrogen dapat diubah menjadi senyawa yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangannya. Berdasarkan pada Ashari (1995), nitrogen dapat dimanfaatkan oleh tanaman sebagai salah satu unsur penyusun protoplasma, klorofil, asam nukleat dan asam amino.

#### KESIMPULAN

Delapan belas isolat rizobakteri pembentuk endospora telah diisolasi dari rizosfer tanaman brokoli sehat di lahan pertanian organik desa Kopeng, Kabupaten Semarang. Isolat RB5 memiliki potensi antibakteri terbesar melawan fitopatogen *Ralstonia solanacearum* dengan daya hambat sebesar 6 mm. Isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*. Isolat tersebut memiliki potensi sebagai agen biofertilizer dengan mampu memproduksi IAA dan melarutkan fosfat. Namun, isolat tersebut tidak mampu memfiksasi nitrogen secara kualitatif.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Laboratorium *Molecular Applied Microbiology*, Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro dan Kelompok Tani Citra Muda Desa Kopeng.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, Z., J. Wu, L. Chen & W. Dong. 2017. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and Its Antagonistic Genes Identified by the Removing PCR. *Scientific Reports* 7: 1777. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01940-9>
- Ahmed, W., J. Yang, Y. Tan, S. Munir, Q. Liu, J. Zhang, G. Ji & Z. Zhao. 2022. *Ralstonia solanacearum*, a Deadly Pathogen: Revisiting the Bacterial Wilt Biocontrol Practices in Tobacco and Other Solanaceae. *Rhizosphere* 21: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100479>
- Akihary, C.V. & B.J. Kolondam. 2020. Pemanfaatan Gen 16S rRNA sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri untuk

- Penelitian-Penelitian di Indonesia. *Pharmakon* 9(1): 16-22.
- Ashari, S. 1995. *Hortikultura Aspek Budidaya*. UI Press, Jakarta.
- Carrol, K.C., S.A. Morse, T. Mietzner & S. Miller. 2016. *Jawetz, Melnick & Adelberg: Medical Microbiology*. McGraw Hill-Medical, USA.
- Davis, W. W. & T. R. Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. I Factors Influencing Variability and Error. *Journal of Applied Microbiology* 22(4): 659-665. <https://doi.org/10.1128%2Fam.22.4.659-665.1971>.
- Gang, S., S. Sharma, M. Saraf, M. Buck & J. Schumacher. 2019. Analysis of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Bio Protocol* 9(9): 3230. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3230>.
- Goswami, D., S. Parmar, H. Vaghela, P. Dhandhukia & J.N. Thakker. 2015. Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an Efficient Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Cogent Food & Agriculture* 1: 1-13. <https://doi.org/10.1080/23311932.2014.1000714>.
- Hasinu, J.V., G.N.C. Tuhumury & H. Kesaulya. 2021. Potential of *Bacillus* spp. as a Biocontrol Agent Against *Ralstonia* Bacterial Wilt in Bananas. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 883. [10.1088/1755-1315/883/1/012039](https://doi.org/10.1088/1755-1315/883/1/012039).
- Herlina, L., K. K. Pukan & D. Mustikaningtyas. 2016. Kajian Bakteri Endofit Penghasil IAA (*Indole Acetic Acid*) untuk Pertumbuhan Tanaman. *Saintekrol* 14(1): 51-58.
- Ihsan, Y.N., K. Fellatami, R. Permana, Y. Mulyani & T.D.K. Pribadi. 2020. Analisis Bakteri Pereduksi Konsentrasi Logam Timbal Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> Menggunakan Gen 16S rRNA. *Jurnal Kelautan* 13(2): 151-162. <http://doi.org/10.21107/jk.v13i2.7285>.
- Istiqomah & E. Kusumawati. 2018. Pemanfaatan *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* dalam Pengendalian Hayati *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tomat. *Jurnal Agro* 5(1): 1-12.
- Lemessa, F. & W. Zeller. 2007. Screening Rhizobacteria for Biological Control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42: 336-344. [doi:10.1016/j.biocontrol.2007.05.014](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.014).
- Maheswar, N.U. & G. Sathiyavani. 2012. Solubilization of Phosphate by *Bacillus* sp. from Groundnut Rhizosphere (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(8): 4007-4011.
- Mangungsong, A., Soemarsono & F. Zudri. 2019. Pemanfaatan Mikroba Tanah dalam Pembuatan Pupuk Organik serta Perannya terhadap Tanah Aluvial dan Pertumbuhan Bibit Tanaman Kakao. *Jurnal Agronomi Indonesia* 47(3): 318-325. <https://doi.org/10.24831/jai.v47i3.24721>.
- Naveed, M., M.A. Qureshi, Z.A. Zahir, M.B. Hussain, A. Sessitsch & B. Mitter. 2015. L-Tryptophan-dependent Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Improves Plant Growth and Colonization of Maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Ann Microbiol* 65: 1381-1389. DOI 10.1007/s13213-014-0976-y.
- Nicholson, W.Y., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh & P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Exterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3): 548-572. <https://doi.org/10.1128%2Fmmbr.64.3.548-572.2000>.
- Noer, S. 2021. Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia* 1(1): 1-6. DOI: 10.26539/edubiologia.v1i1.8596.
- Rahman, M.M.E., D.M. Hossain, K. Suzuki, A. Shiiya, K. Suzuki, T.K. Dey, M. Nonaka & N. Harada. 2016. Suppressive Effects of *Bacillus* spp. on Mycelia, Apothecia and Sclerotia Formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and Potential as Biological Control of White Mold on Mustard. *Australasian Plant Pathology* 45: 103-117. DOI 10.1007/s13313-016-0397-4.
- Roy, S.S., R. Dasgupta & A. Bagchi. 2014. A Review on Phylogenetic Analysis: A Journey through Modern Era. *Computational Molecular Bioscience*



4:39-45.

<http://dx.doi.org/10.4236/cmb.2014.43005>.

5.

- Sumarno, M., A. Budiharjo & S. Pujiyanto. 2014. Potensi Rizobakteri Pembentuk Endospora dari Tanaman Padi sebagai Biokontrol Fitopatogen *Xanthomonas oryzae*. *Jurnal Biologi* 3 (3): 7-17.
- Tejera, B., M. Heydrich & M. Rojas. 2013. Aislamiento de *Bacillus* Solubilizadores de Fosfatos Asociados al Cultivo del Arroz. *Agronomia Mesoamericana* 24(2): 357-364.  
<http://dx.doi.org/10.15517/am.v24i2.12535>.
- Tuhumury, G.N.C., J.V. Hasinu & H. Kesaulya. 2021. Activity Test of *Bacillus* Spp. Against Bacterial Wilt (*R. solanacearum*) on Tomatoes by *in Vitro*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 883. doi:10.1088/1755-1315/883/1/012027.
- Vásconez, R.D.A., J.E.M. Mossot, A.G.O. Shagñay, E.M.T. Moya, V.P.C. Utreras & I.D.L.Á.V. Suquillo. 2020. Evaluation of *Bacillus* Spp. as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Lettuce (*Lactuca sativa*). *Cienc. Tecnol. Agropecuaria* 21(3): 1-16.  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num3\\_art:1465](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1465).
- Verma, R., A. Dutta, A.K. Choudhary & S. Maurya. 2014. Control of *Ralstonia solanacearum* Infection in Tomato, Brinjal and Capsicum by Antibiotic Sensitivity Test. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology* 5(3): 35-40.
- Wan, W., Y. Qin, H. Wu, W. Zuo, H. He, J. Tan, Y. Wang & D. He. 2020. Isolation and Characterization of Phosphorus Solubilizing Bacteria with Multiple Phosphorus Sources Utilizing Capability and Their Potential for Lead Immobilization in Soil. *Frontiers in Microbiology* 11(752): 1-15.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>.
- Wunderlin, T., T. Junier, C. Paul, N. Jeanneret & P. Junier. 2016. Physical Isolation of Endospores from Environmental Samples by Targeted Lysis of Vegetative Cells. *Journal of Visualized Experiments* 107: 53411. <https://doi.org/10.3791%2F53411>.
- Wulansari, N.T. Y. Ramona & M.W. Proborini. 2015. Identifikasi Antagonis dari *Xanthomonas campestris* yang Diisolasi dari *Rhizosphere* Perkebunan Brokoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) di Desa Kembang Merta, Kabupaten Tabanan, Bali. *Jurnal Metamorfosa* 2(1): 29-33.