

OPTIMASI PERTUMBUHAN DAN POTENSI ANTAGONISTIK
Bacillus pumilus TERHADAP PATOGEN *Xanthomonas*
campestris SERTA IDENTIFIKASI MOLEKULER GEN
PENYANDI PKS DAN NRPS

Laila Nur Faizah, Anto Budiharjo, Endang Kusdiyantini
Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Tembalang, Semarang
Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690
Email: ellafaizah12@gmail.com

ABSTRAK

Xanthomonas campestris merupakan salah satu patogen tanaman brokoli yang sulit untuk diberantas. *B. pumilus* merupakan agen biokontrol yang prospektif karena mampu menghasilkan senyawa antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur patogen. Selain itu *B. pumilus* memiliki daya tahan terhadap lingkungan ekstrem dengan kemampuan pembentukan spora. Beberapa spesies dari genus *Bacillus* telah dilaporkan memiliki gen yang menyandi PKS (*Polyketide Synthetase*) dan NRPS (*Non-Ribosomal Peptide Synthetase*) yang merupakan enzim mega sintetase untuk berbagai senyawa antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat *B. pumilus* terhadap *X. campestris*, mengidentifikasi gen penyandi PKS dan NRPS serta mengetahui pertumbuhan optimum *B. pumilus* pada pH dan sumber karbon yang berbeda. Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga ulangan pada dua parameter pertumbuhan yang berbeda yaitu pH dan sumber karbon. Perlakuan pH dilakukan pada pH 5, 6, 7, dan 8, sementara perlakuan sumber karbon dilakukan dengan glukosa, fruktosa dan sukrosa sebagai sumber karbon. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dengan taraf signifikansi 95%. Hasil penelitian menunjukkan kemampuan *B. pumilus* untuk menghambat pertumbuhan *X. campestris* menghasilkan zona hambat dengan diameter 1,84 mm. Hasil identifikasi gen penyandi PKS menunjukkan hasil positif. Hasil analisis penyejajaran sekuens dengan BLAST gen PKS *B. pumilus* menunjukkan homologi sebesar 98% dengan gen PKS bakteri *Bacillus subtilis* HNS005. Optimasi pertumbuhan menunjukkan pertumbuhan optimum *B. pumilus* pada pH 6 dan glukosa sebagai sumber karbon.

Kata kunci: *biokontrol*, *B. pumilus*, *PKS*, *NRPS*, *optimasi pertumbuhan*

ABSTRACT

Xanthomonas campestris is one of the broccoli pathogen that difficult to be eradicated. *B. pumilus* is a prospective biocontrol agent due to its ability to produce antibiotal substances that inhibit the growth of pathogenic bacteri and

fungi. Beside that, *B. pumilus* have a great endurance to extreme environment by its ability to form spores. Some species of *Bacillus* genus have been reported to have PKS (Polyketide Synthetase) and NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase) coding gene which is a mega shyntetase that have a role in the production of antibiotic substances. This reseach aims to test the inhibitory potency of *B. pumilus* toward *X. campestris*, identify the PKS and NRPS coding gene and to knowing the optimum growth of *B. pumilus* on the medium with different pH and carbon source. Reseach is conducted with Completely Randomized Design (CRD) with three replications on two growth parameters that is pH and carbon source. pH treatment is conducted with pH 5, 6, 7, and 8, while carbon source treatment is conducted with glucose, fructose, and sucrose as the carbon source. The obtained result is analized with ANOVA with significant level of 95%. The result shows *B. pumilus* ability to inhibits the growth of *X. campestris* producing inhibitory zone with 1,84 mm of diameter. The reseach showed negative result in NRPS coding gene detection and a positive result in PKS coding gene. PKS coding gene identification which is analized with BLAST shows 98% homology with PKS coding gene of *Bacillus subtilis* HNS005. Growth optimization shows the optimum groth of *B. pumilus* at pH 6 and glucose as the carbon source.

Keywords: *biocontrol*, *B. pumilus*, *PKS*, *NRPS*, *growth optimization*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris dan pembangunan di bidang pertanian menjadi prioritas utama dalam pembangunan ekonomi regional (Sucihatningsih dan Waridin, 2010). Salah satu komoditas sayuran yang banyak dibudidayakan adalah tanaman dari genus *Brassica*. Penyakit yang sering menyerang tanaman brokoli adalah penyakit busuk hitam yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas campestris* Dows (Rukmana, 1994).

Berbagai alternatif pengendalian penyakit tanaman dikembangkan untuk mengurangi efek negatif yang ditimbulkan oleh pestisida berbahan kimia. Salah satu metoda alternatif yang dikembangkan adalah pemanfaatan antagonis dari patogen tanaman. Metoda ini sering disebut dengan biokontrol (Pal and Gardener, 2006). *Bacillus* sp. merupakan salah satu rhizobakteri yang paling prospektif untuk dikembangkan menjadi agen biokontrol, karena mampu menghasilkan senyawa antibiotik dan memiliki pertumbuhan yang cepat.

Menurut Priest (1993) dalam Parvathi (2009) karena kemampuan *Bacillus* sp. untuk membentuk spora dan bertahan dalam berbagai perbedaan kondisi lingkungan, *Bacillus* spp. beradaptasi dengan mudah terhadap berbagai habitat.

Anggota genus *Bacillus* berpotensi memiliki peran dalam sintesis Poliketid (PK) dan Nonribosomal Peptid (NRP) (Fickers *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Maerani (2014), diketahui bahwa *Bacillus pumilus* mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan patogen *Xanthomonas oryzae*. Peran ekologis *B. pumilus* diperkuat dengan fakta bahwa bakteri ini mampu memproduksi senyawa antagonis terhadap patogen bakteri dan jamur (Banerjee *et al.*, 2007). Potensi *B.pumilus* sebagai agen biokontrol mendorong perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan *B. pumilus* untuk menghambat pertumbuhan patogen *X.campestris*, identifikasi gen penyandi PKS dan NRPS, dan optimasi pertumbuhan *B. pumilus*.

BAHAN DAN METODE

Isolat *B. pumilus* diperoleh dari isolasi rizobakteri dari daerah pertanian Salatiga, Jawa Tengah. Identifikasi dilakukan secara molekuler dengan PCR 16S dan karakterisasi secara fisiologis dilakukan berdasarkan aturan *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* (Maerani, 2014).

Uji Aktivitas Antibakteri *B. pumilus* terhadap *X. campestris*

Isolat *B. pumilus* dan *X. campestris* ditumbuhkan pada 5 mL medium NB selama *overnight* pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm. Sebanyak 2,5 ml *X. campestris* dicampurkan pada 50 mL NA yang bersuhu 45°C kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga dingin. Sebanyak 15 µL kultur *B. pumilus* diteteskan pada *paper disc* 7 mM dan dilakukan sebanyak 4 ulangan, diletakkan pada medium NA sudah dicampurkan dengan *X. campestris* di dalam petri. Kontrol negatif *paper disc* ditetesi dengan 15 µL media NB dan diletakkan di bagian tengah petri. Petri yang berisi kultur *X. campestris* dan *B. pumilus* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C. Pengukuran zona hambat dilakukan setelah 48 jam.

Ekstraksi DNA *B. pumilus*

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, Geneaid*. Hasil akhir berupa supernatan merupakan DNA yang siap digunakan untuk proses PCR. Penghitungan konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan Nanodrop 2000.

Amplifikasi Gen Penyandi PKS (PCR - PKS)

Primer yang digunakan untuk PCR PKS ialah KSDPQQF (5' MGN GAR GCN NWN SMN ATG GAY CCN CAR CAN MG 3') dan KSHGTGR (5' GGR TCN CCN ARN SWN GTN CCN GTN CCR TG 3') (Radjasa, 2005). Amplifikasi gen penyandi PKS dilakukan dengan mesin DNA *thermal cycler* (MyCycler, BioRad) dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 2 menit; kemudian berturut-turut denaturasi (94 °C selama 1 menit), *annealing* (55 °C selama 1 menit), dan *extension* (72 °C selama 2 menit). Rangkaian denaturasi, *annealing* dan *extension* diulang hingga 45 siklus (Radjasa, 2005).

Amplifikasi Gen Penyandi Non-Ribosomal Peptide Synthetases (PCR-NRPS)

Primer yang digunakan untuk PCR NRPS ialah primer A2gamF (5' AAG GCN GGC GSB GCS TAY STG CC 3') dan A3gamR (5' TTG GGB IKB CCG GTS GIN CCS GAG GTG 3') (Radjasa *et al.*, 2007). Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin DNA *thermal cycler* (MyCycler, BioRad) dengan siklus sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 2 menit, kemudian berturut-turut denaturasi (94 °C selama 1 menit), *annealing* (70 °C selama 1 menit) dan *extension* (72 °C selama 2 menit). Rangkaian denaturasi, *annealing* dan *extension* diulang hingga 40 siklus (Radjasa *et al.*, 2007). Optimasi PCR NRPS dilakukan menggunakan 6 suhu *annealing* yaitu 65⁰, 66⁰, 67⁰, 69⁰, 70⁰, dan 71⁰C.

Visualisasi produk PCR

Visualisasi produk PCR PKS dan NRPS dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarose 1% dalam TAE

0,5 x, voltase sebesar 100 V selama 30 menit. Gel kemudian direndam ethidium bromida selama 20 menit dan visualisasi menggunakan alat *gel documentation* UVITEC Cambridge.

Analisis Sekuens

Sekuens yang diperoleh dari PCR disejajarkan dengan sekuens pembandingan yang didapat dari *gene bank* menggunakan tool BLAST pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Pembuatan Inokulum / Starter

Inokulum ditumbuhkan dengan medium dengan komposisi (g/L): glucose (5.625); soybean peptone (13), K_2HPO_4 (2.125); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.875); NaCl (5); $CaCl_2$ (0.05). Kultur diinkubasi pada suhu 30°C 120 rpm selama 24 jam atau hingga kepadatan sel sebanyak 10^7 sel/mL.

Pertumbuhan *B. pumilus*

Pertumbuhan *B. pumilus* dilakukan pada medium dengan komposisi sama dengan medium inokulum tiga ulangan. Kultur diinkubasi pada suhu 30°C 120 rpm. Pertumbuhan diukur dengan metode turbiditas menggunakan spektrofotometri. Pengambilan sampel dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan pengambilan sampel 24 jam sekali sampai kurva pertumbuhan menunjukkan penurunan OD.

Pertumbuhan pada *B. pumilus* pH Medium yang berbeda

Pertumbuhan dilakukan dengan komposisi media (g/L): glucose (5.625); soybean peptone (13), K_2HPO_4 (2.125); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.875); NaCl (5); $CaCl_2$ (0.05). pH media diatur dengan penambahan larutan NaOH 1N

dan HCl 1N pada 5, 6, 7, 8 dengan tiga ulangan. Inokulasi dari starter ke dalam media sebanyak 5 % (v/v), kultur dinkubasi pada suhu 30°C, agitasi 120 rpm. Pertumbuhan diukur setiap 24 jam hingga kurva menunjukkan penurunan OD.

Pertumbuhan pada Sumber C yang Berbeda (glukosa, fruktosa, sukrosa)

Pertumbuhan dilakukan dengan komposisi media dimodifikasi sebagai berikut (g/L): sumber karbon (glukosa, fruktosa, sukrosa) (5.625); soybean peptone (13), K_2HPO_4 (2.125); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.875); NaCl (5); $CaCl_2$ (0.05). pH media diatur menjadi pH 6. Inokulasi dari starter ke dalam media sebanyak 10 % (v/v). Kultur dinkubasi pada suhu 30°C, agitasi 120 rpm. Pertumbuhan diukur setiap 24 jam hingga kurva menunjukkan penurunan OD.

Analisis Data

Pengukuran pertumbuhan pada medium dengan pH dan sumber C yang berbeda dianalisis dengan ANOVA untuk mengetahui pengaruh pH dan sumber C terhadap pertumbuhan *B. pumilus* pada jam ke 48.

HASIL DAN PEMBAHASAN

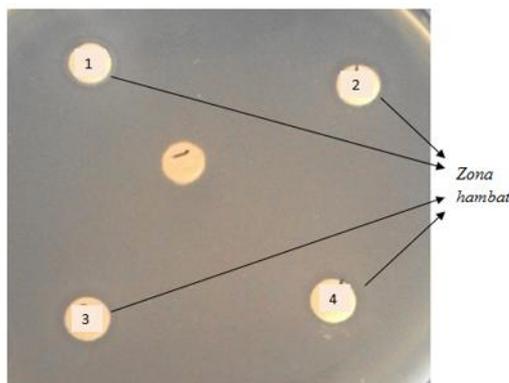
Uji Aktivitas Antibakteri *B. pumilus* terhadap *X. campestris*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Pengamatan zona hambat dilakukan setelah 48 jam inkubasi. Hasil uji aktivitas antibakteri *B. pumilus* terhadap pertumbuhan *X. campestris* tertera pada Tabel 1. Gambar 1 menunjukkan adanya zona hambat atau *clear zone* pada *paper disc* yang ditetesi *B. pumilus* sementara kontrol negatif tidak menghasilkan *clear zone*. Hasil

pengukuran daya hambat yang diperoleh adalah hasil rata-rata dari pengukuran empat ulangan. Berdasarkan hasil pengukuran *B. pumilus* mampu menghasilkan diameter daya hambat sebesar 1,84 mm pada jam ke 48.

Menurut Davis dan Stout (1971) dalam Fitri dan Betty (2010), kriteria kekuatan daya antibakteri terbagi menjadi beberapa kategori, antara lain: diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, dan diameter zona hambat lebih dari 20 mm dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kategori tersebut maka kemampuan daya hambat *B. pumilus* terhadap pertumbuhan *X. campestris* termasuk dalam kategori lemah.

Al-Sarairoh *et al.*, (2015) menyatakan bahwa beberapa penelitian melaporkan bahwa strain *Bacillus* mampu memproduksi sejumlah besar peptida antimikroba dengan struktur kimia yang berbeda. Nithya dan Pandian (2009) menyatakan bahwa *B. pumilus* memiliki kisaran yang paling luas pada penghambatan patogen Gram positif dan Gram negatif.



Gambar 1. Uji aktivitas antibakteri *B. pumilus* terhadap *X. campestris* inkubasi 48 jam pada suhu 30°C

Tabel 1. Hasil Pengukuran Zona Hambat *B. pumilus* pada uji Antibakteri terhadap *X. campestris* setelah inkubasi 48 jam

Ulangan	Diameter Zona Hambat (mm)
1	2,21
2	1,2
3	2,12
4	1,82

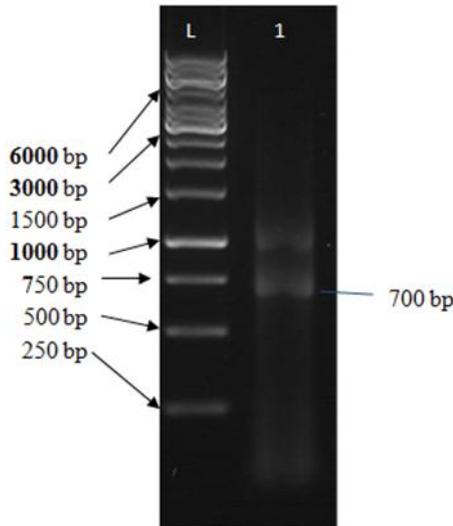
Ekstraksi DNA *B. pumilus*

Ekstraksi dilakukan menggunakan kit ekstraksi DNA yaitu Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit Protocol. Konsentrasi dan kemurnian hasil ekstraksi DNA diukur dengan Nanodrop 2000. Hasil yang diperoleh dari ekstraksi memiliki konsentrasi sebesar 64,1 ng/μL dan kemurnian berdasarkan absorban 260/280 dan 260/230 masing masing 1,94 dan 2,03. Khosravinia *et al.*, (2007) DNA dikatakan terkontaminasi RNA jika memiliki rasio $OD_{260}/OD_{280} > 2,0$. Devereux & Wilkinson (2004) juga menjelaskan bahwa rasio $OD_{260}/OD_{280} < 1,8$ menunjukkan adanya kontaminasi fenol atau protein pada hasil ekstraksi.

Amplifikasi Gen Penyandi PKS

Visualisasi hasil PCR PKS (Gambar 2) menghasilkan adanya 1 band produk yang diduga sebagai gen penyandi PKS yang berdasarkan pembacaan dengan DNA ladder memiliki panjang 700 bp. Produk PCR selanjutnya disekuensing yang bertujuan untuk memperoleh urutan basanya. Urutan basa yang diperoleh dari sekuensing kemudian dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment*

Search Tool (BLAST) untuk mengetahui homologinya dengan urutan basa gen PKS yang ada pada database.



Gambar 2. Visualisasi UV hasil PCR PKS *B. pumillus* dalam agarose 1% dan 1kb DNA Ladder (L: DNA Ladder, 1: produk PCR)

Hasil sekuensing disejajarkan menggunakan BLAST (Gambar 3) menunjukkan band produk PCR *B. pumillus* memiliki homologi sebesar 98% dengan gen PKS bakteri *Bacillus subtilis* HNS005. Penyejajaran sekuens dengan gen PKS bakteri *Bacillus subtilis* HNS005 menghasilkan *E-value* sebesar 0,0 yang menunjukkan homologi yang tinggi antara sekuens yang disejajarkan. Menurut Claverie & Notredame (2007), *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuens. Semakin tinggi nilai *E-value* maka semakin rendah homologi antara kedua sekuens, sebaliknya semakin rendah nilai *E-value* maka semakin tinggi homologi antara kedua sekuens.

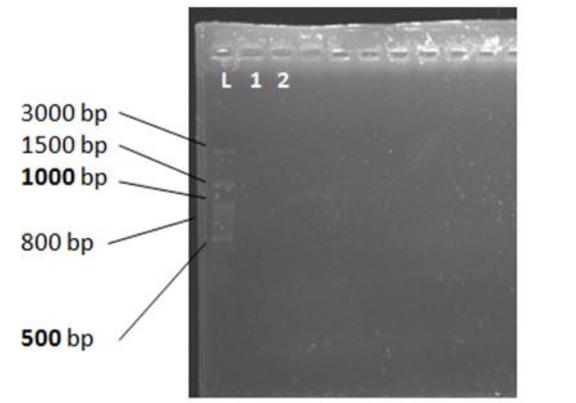
Bacillus subtilis strain HNS005: polyketide synthase (PKS) gene, partial cds
Sequence ID: JX244216.1 Length: 676 Number of Matches: 1

Range	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1091 to 1502	1091	0.0	627/613(98%)	6/513(0%)	Plus/Plus
Query 12			CTTCAGTCCATATC-ATG-TTTG-AGATGCTGGTTACGACAGGAGTGGAGTAAAGAT		67
Subject 28			CTTCAGTCCATATCAGTATTTTGGAGTGGCTGGTTACGACAGGAGTGGAGTAAAGAT		67
Query 88			TCAATACCCGATTTTACATTTCCAGCAGTATGACATTTACTCTGAGGATTTGGCTAA		127
Subject 38			TCAATACCCGATTTTACATTTCCAGCAGTATGACATTTACTCTGAGGATTTGGCTAA		127
Query 128			TTCCAGCCCTTAAATGTTTCCAGGAAATATTCCTCTTTACGCGCTCAAGATTTCTTAT		187
Subject 148			TTCCAGCCCTTAAATGTTTCCAGGAAATATTCCTCTTTACGCGCTCAAGATTTCTTAT		207
Query 188			ATTTTAAATTAAGAGGAGCTCTATATGTTGATGCTACTGTGGCTCTCATTTG		247
Subject 208			ATTTTAAATTAAGAGGAGCTCTATATGTTGATGCTACTGTGGCTCTCATTTG		267
Query 248			AGATTAATTAAGAGGAGCTCTATATGTTGATGCTACTGTGGCTCTCATTTG		307
Subject 268			AGATTAATTAAGAGGAGCTCTATATGTTGATGCTACTGTGGCTCTCATTTG		327
Query 308			GGTCTTAATTTTCCCTTATCCGATAGATAGTCAAGGACTGTTATGATGCTGCTGCT		367
Subject 328			GGTCTTAATTTTCCCTTATCCGATAGATAGTCAAGGACTGTTATGATGCTGCTGCT		387
Query 368			ATTATGCTCAGGACAGGAGTGTAAACCTTTACGAGCTCAGCTAGTGGGATGGAGGA		427
Subject 388			ATTATGCTCAGGACAGGAGTGTAAACCTTTACGAGCTCAGCTAGTGGGATGGAGGA		447
Query 428			GGAGAGGAGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGT		487
Subject 448			GGAGAGGAGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGT		507
Query 488			AATTCACCCCTTATATTTCCCTCTAAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT		547
Subject 508			AATTCACCCCTTATATTTCCCTCTAAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT		567
Query 548			AGGAGGAGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGT		607
Subject 568			AGGAGGAGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGT		627
Query 608			ATTAATCTTATTAATTTACTGATTAAGTGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT		659
Subject 628			ATTAATCTTATTAATTTACTGATTAAGTGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT		679

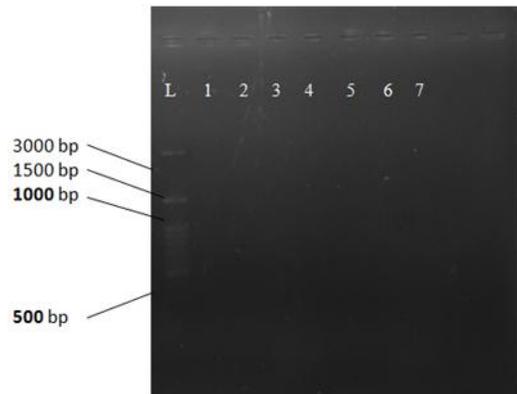
Gambar 3. Analisis homologi gen PKS *Bacillus pumillus* dengan data *gene bank* NCBI

Amplifikasi Gen Penyandi NRPS

Hasil visualisasi produk PCR NRPS (Gambar 4) menunjukkan tidak adanya band yang dihasilkan dari PCR. Kemudian dilakukan optimasi PCR dengan menggunakan 6 suhu annealing yang berbeda, yaitu 65^o, 66^o, 67^o, 69^o, 70^o, dan 71^oC. Hasil visualisasi optimasi PCR (Gambar 5) menunjukkan tidak adanya band yang terbentuk dari produk PCR. Hal ini menunjukkan tidak adanya gen yang teramplifikasi yang diduga dikarenakan *B. pumillus* tidak memiliki gen penyandi NRPS.



Gambar 4. Visualisasi produk PCR NRPS *B. pumilus* dalam agarose 1% dan 1kb DNA Ladder (L: DNA Ladder, 1: kontrol negatif, 2: produk PCR)

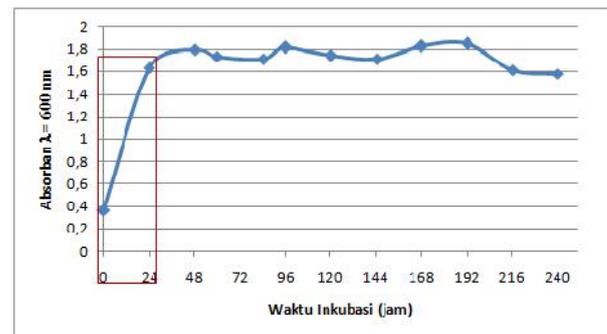


Gambar 5. Visualisasi produk optimasi PCR NRPS *B. pumilus* dalam agarose 1% dan 1kb DNA Ladder (L: DNA Ladder, 1: kontrol negatif, 2: produk PCR suhu annealing 65, 3: produk PCR suhu annealing 66, 4: produk PCR suhu annealing 67, 5: produk PCR suhu annealing 69, 6: produk PCR suhu annealing 70, 7: produk PCR suhu annealing 71)

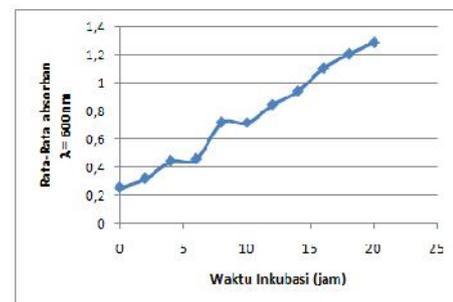
Penelitian melaporkan gen penyandi NRPS terdeteksi pada beberapa anggota genus *Bacillus*, namun belum ada yang melaporkan deteksi gen NRPS pada *B. pumilus*. Sanchez *et al.* (2010) berpendapat bahwa saat ini eksplorasi mengenai mikroorganisme baru mencapai kurang dari 1% dari seluruh mikroorganisme yang ada. Fickers *et al.* (2012) menambahkan anggota genus *Bacillus* lebih dari 4% yang diketahui memiliki peran dalam sintesis poliketid, nonribosomal peptida, dan bakteriosin.

Pertumbuhan *B. pumilus* pada pH 7 dan Sumber Karbon Glukosa

Starter atau inokulum perlu dibuat terlebih dahulu sebelum pengukuran pertumbuhan dilakukan. Starter bertujuan untuk mempersingkat fase adaptasi sel dengan cara melakukan inokulasi ke dalam medium fermentasi yang sama dengan medium starter saat bakteri berada pada fase log. Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan hasil pengukuran OD setiap dua jam sekali selama 24 jam. Kurva yang diperoleh dari hasil pengukuran ini menunjukkan pertumbuhan *B. pumilus* yang lambat, oleh karena itu kurva pertumbuhan dilanjutkan dengan pengukuran OD kultur setiap 24 jam sekali.



Gambar 6. Kurva Pertumbuhan *B. pumilus* pada Medium pH 7 dan glukosa sebagai sumber karbon selama 240 jam pada suhu 30°C



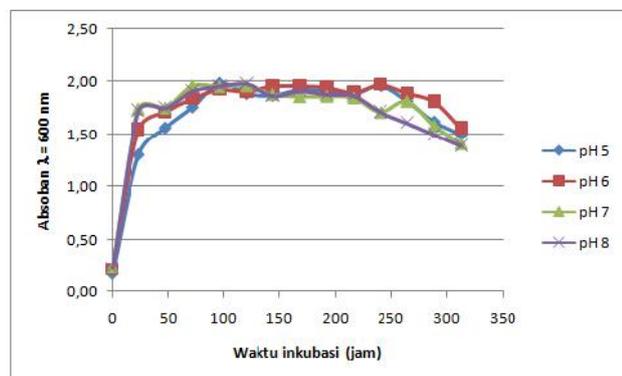
Gambar 7 Fase Ekspensial *B. pumilus* pada Medium dengan pH 7 dan glukosa sebagai sumber karbon inkubasi suhu 30°C selama 24 jam

Kurva pertumbuhan yang diperoleh menunjukkan fase pertumbuhan *B. pumilus* yaitu fase logaritmik dan fase stasioner. Fase adaptasi tidak dialami oleh kultur karena penggunaan starter dengan medium yang sama sehingga bakteri sudah beradaptasi dan langsung memasuki fase log. Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4.6 dan 4.7 dapat diketahui bahwa fase stasioner kultur *B. pumilus* pada medium optimasi terjadi mulai jam ke 48. Menurut Hardjo *et. al.*, (1989) fase pertumbuhan mikrobial terdiri dari 3 fase. Fase pertama adalah fase lambat yang sering disebut fase adaptasi. Fase ini ditandai dengan pertumbuhan mikrobial dengan lambat. Fase kedua adalah fase eksponensial. Fase ini ditandai dengan adanya pertumbuhan yang sangat cepat dari sel produk fermentasi. Fase ketiga adalah fase stasioner. Fase stasioner ditandai dengan adanya pertumbuhan sel yang tetap atau sebagai titik mulai turunnya pertumbuhan disertai dengan produk primernya.

Optimasi Pertumbuhan Pertumbuhan *B. pumilus* pada Medium dengan pH Berbeda

Pengukuran pertumbuhan dilakukan setiap 24 jam sekali selama 312 jam untuk melihat pola pertumbuhan *B. pumilus* hingga terjadi penurunan jumlah sel yang ditandai dengan penurunan OD. Hasil pengukuran pertumbuhan ditunjukkan pada Gambar 4.8. Berdasarkan kurva dapat disimpulkan bahwa kultur pada keempat perlakuan pH langsung memasuki fase log kemudian

dilanjutkan fase stasioner setelah jam ke 50. Penurunan jumlah sel atau fase kematian pada perlakuan pH 7 dan 8 dimulai pada jam ke 240, sementara pada perlakuan pH 5 dan 6 fase kematian dimulai pada jam ke 264. Selain itu kurva pertumbuhan juga menunjukkan penurunan pertumbuhan perlakuan pH 6 terjadi lebih lambat dibandingkan dengan perlakuan lain. Hal ini ditunjukkan dengan lebih tingginya nilai absorbansi perlakuan pH 6 pada jam 288.



Gambar 8 Kurva Pertumbuhan 312 jam *B. pumilus* pada Medium dengan pH yang Berbeda

Kurva pertumbuhan (Gambar 8) juga menunjukkan pertumbuhan *B. pumilus* pada pH 8 mengalami penurunan jumlah sel yang lebih cepat dibandingkan dengan pH lainnya, yaitu pada jam ke 240. Menurut Zulaikhah (2005), pada pH < 5,0 dan > 8,0 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik. Uji statistik ANOVA dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan pH yang berbeda terhadap pertumbuhan *B. pumilus* pada jam ke 48 yang merupakan puncak fase eksponensial dan awal fase stasioner. Hasil uji ANOVA menunjukkan tidak adanya pengaruh yang signifikan antara perlakuan pH yang berbeda terhadap

pertumbuhan *B. pumilus* pada jam ke 48 dengan nilai sig > 0,05 (Tabel 2).

Kurva pertumbuhan pada Gambar 4.8 menunjukkan adanya perbedaan yang tidak nyata pertumbuhan *B. pumilus* pada medium dengan pH yang berbeda. Perbedaan pertumbuhan *B. pumilus* pada pH yang berbeda disebabkan karena pH mempengaruhi aktivitas enzim yang berperan dalam proses pertumbuhan bakteri. Pelczar dan Chan (2005) menyatakan apabila pH dalam suatu medium atau lingkungan tidak optimal, maka akan mengganggu kerja dari enzim-enzim, yang pada akhirnya akan mempengaruhi pertumbuhan bakteri itu sendiri. Noviana dan Raharjo (2009) menambahkan bahwa derajat keasaman (pH) optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri berlangsung antara pH 6,5 dan 7,5. Penelitian Hasan *et al.*, (2009) menunjukkan pertumbuhan *B. pumilus* optimum pada pH 6-7.

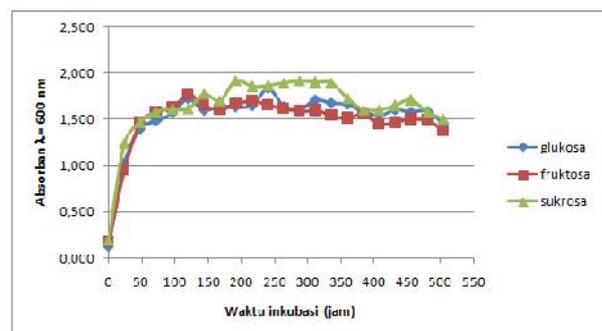
Pertumbuhan *B. pumilus* pada Medium dengan Sumber Karbon yang Berbeda

Menurut Tamber *et al.* (2008), unsur karbon sangat penting bagi pertumbuhan bakteri. Sumber karbon atau *carbon source* antara bakteri satu dengan bakteri lain tidaklah sama. Telah diketahui bahwa berat unsur karbon merupakan setengah dari berat kering bakteri. Pengukuran pertumbuhan dilakukan dengan turbidimetri pada OD 600 setiap 24 jam sekali selama 504 jam. pH medium yang digunakan ialah pH 6 yang memberikan hasil pertumbuhan paling baik pada perlakuan pH.

Hasil pengukuran turbiditas (Gambar 9) menunjukkan pertumbuhan

yang berbeda pada ketiga perlakuan. Perlakuan glukosa dan fruktosa mengalami fase log hingga jam ke 120 kemudian memasuki fase stasioner hingga jam ke 480. Sementara pada perlakuan sukrosa kultur masih mengalami fase log hingga jam ke 144. Lebih panjangnya fase log pada perlakuan sukrosa diduga karena sukrosa merupakan disakarida yang perlu dipecah menjadi monomernya terlebih dahulu sebelum dapat diserap oleh sel.

Uji statistik dengan ANOVA (Tabel 3) dilakukan untuk mengetahui



pengaruh perlakuan sumber karbon terhadap pertumbuhan *B. pumilus* pada jam ke 48. Berdasarkan uji ANOVA dapat disimpulkan tidak adanya pengaruh yang signifikan pada perlakuan sumber karbon yang berbeda terhadap pertumbuhan *B. pumilus* dengan nilai sig < 0,05. Berdasarkan kurva pertumbuhan diduga glukosa merupakan sumber karbon yang paling baik untuk pertumbuhan *B. pumilus*. Menurut Hasan *et al.*, (2009) glukosa merupakan sumber karbon yang sangat baik bagi pertumbuhan bakteri. Sanchez *et al.*, (2010) menambahkan bahwa glukosa merupakan substrat yang lebih baik pada *B. subtilis* dan keberadaannya menekan penggunaan substrat lainnya.

Gambar 4.9 Kurva pertumbuhan *B. pumilus* pada Medium dengan sumber karbon yang Berbeda

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat ditarik kesimpulan bahwa *B. pumilus* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *X.campestris* dengan kategori lemah. *B. pumilus* menunjukkan hasil negatif pada deteksi gen penyandi NRPS namun hasil positif diperoleh pada deteksi gen penyandi PKS. Hasil analisis gen penyandi PKS *B. pumilus* memiliki homologi sebesar 98% dengan gen PKS bakteri *Bacillus subtilis* HNS005. Optimasi pertumbuhan *B. pumilus* menunjukkan pertumbuhan optimum dicapai pada pH 6 dan glukosa sebagai sumber karbon menunjukkan pertumbuhan optimum pada pH 6.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Saraireh, Hashem, Wael A. Al-Zereini, and Khaled A. Tarawneh. 2015. Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites from a Soil *Bacillus* sp. 7B1 Isolated from South Al-Karak, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences. Volume 8, Number 2, June .2015*
- Banerjee, S.; Devaraja, T.N.; Shariff, M.; Yusoff, F.M. 2007. Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and artemia. *J. Fish. Dis.*, 30 (7), 383-389.
- Claverie, Jean-Michel, and Cedric Notredame. 2007. *Bioinformatics for Dummies*. Hoboken, N.J.: Wiley Pub.
- Davis & Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Journal of Microbiology*. Vol 22 No 4.
- Devereux, R and S. S.Wilkinson. 2004. Amplification of Ribosomal RNA Sequences. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Fickers, P. 2012. Antibiotic Compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 8 (1): 38-43, 2012 ISSN 1553-3468
- Fitri, L. dan B.M.Bustam. 2010. Screening of antimicrobial producing strains isolated from the soil of grassland rhizosphere in Pocut Meurah Intan Forest Park, Seulawah, Aceh besar. *Biodiver*.11 (3): 129-132.
- Hardjo, S., N. S. Indrasti, dan T. Batancut. 1989. *Biokonversi: Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian*. PAU-Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor.
- Hasan, F., Samiullah Khan, Aamer Alishah and Abdul Hameed. 2009. Production of Antibacterial Compounds by Free and Immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pak. J. Bot.* 41(3): 1499-1510.
- Ketaren, S. 1990. *Kinetika Reaksi Biokimia*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jederal Pendidikan Tinggi PAU Bioteknologi. IPB, Bogor
- Khosravinia, H., H.N.N. Murthy, D.T. Parasad, & N. Pirany. 2007. Optimizing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood. *African Journal of Biotechnology*. 6 (4): 481-486.
- Klopper, J.W., W. Mahaffee, J.A. Mcinroy, and P.A. Backman. 1991. Comparative analysis of isolation methods for recovering rootcolonizing bacteria from roots. p. 252-255. *In C. Keel, B. Koller, and G. Defago (Eds.). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Progressand Prospects. The Second International Workshop on PGPR. Interlaken, Switzerland, October 14-19, 1990.*
- Lopez, N. I., Haedo, A. S., Mendez, B. S. 1999. Evaluation of 15. *Xanthomonas campestris* survival in a soil microcosm system. *Int Microbiol. Volume 2: 111-114.*

- Maerani. 2014. Bioprospeksi Endospore-Forming Rizobakteri dari Tanaman Padi sebagai Biokontrol Fitopatogen *Xanthomonas oryzae*. *Skripsi*. Jur. Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nithya dan Pandian SK. 2009. Isolation of Heterotrophic Bacteria from PALK BAY Sediments Showing Heavy Metal Tolerance and Antibiotic Production. *Microbiol Res.* doi:10.1016/j.micres.2009.10.004.
- Noviana, L dan Raharjo, B. 2009. Viabilitas Rhizobakteri *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.3 pada Media Pembawa Tanah Gambut Disubstitusi dengan Padatan Limbah Cair Industri Rokok. *BIOMA*. 11(1): 30-39.
- Pal K K and B McSpadden Gardener. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. p1-25.
- Parvathi, A., Kiran Krishna, Jiya Jose, Neetha Joseph, Santha Nair. 2009. Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus Pumilus* Isolated from Coastal Environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:269-275. ISSN 1517-8382.
- Pelczar, MJ dan Chan, E.C.S. 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jilid 2. Penerjemah Ratna Siri Hadioetomo, Teja Mas, S. Sutarmi Tjitrosomo & Sri Lestari Angka. UI Press. Jakarta.
- Priest, F.G. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Hoch, J.A.; Losick, R. (eds.). *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics*. ASM Press, Washington DC.
- Radjasa, O. K. 2005. The Search for Antimicrobial Compounds from Marine-Invertebrate Associated-Bacteria: Prosiding International Symposium Marine Natural Products. UNDIP, Semarang.
- Radjasa, O.K., T. Martens., H.P. Grossart., T. Brinkoff., A. Sabdono., and M. Simon. 2007. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 7(2):239-246
- Rukmana. 1994. *Budidaya Kubis Bunga dan Brokoli*. Yogyakarta : Kanisius.
- Sanchez, S., et al. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics* (2010) 63, 442–459
- Sucihatningsih, DWP dan Waridin. 2010. Penguatan kapasitas kelembagaan Model penyuluhan pertanian dalam meningkatkan kinerja melalui pertanian biaya transaksi. *Jurnal Ekonomi Pembangunan (JEP)*, Vol. 11 No. 1, pp. 13-29.
- Tamber, S., Ochs, M.M., and Hancock, R.E. 2006. Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 45-54.
- Tamber, S., Ochs, M.M., and Hancock, R.E. 2006. Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 45-54.
- Zulaikhah, S.T. 2005. Analisis Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Pencemaran Mikroba pada Jamu Gendong di Kota Semarang. [Tesis]. Semarang: MAgister Kesehatan Lingkungan, Program Pasca Sarjana, Universitas Diponegoro.