

IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF PADA ISOLAT BAKTERI
BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) SEBAGAI
AGENSIA HAYATI *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Aniza Rachmawati, Agung Suprihadi, dan Endang Kusdiyantini

Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika,
Universitas Diponegoro Tembalang, Jln Prof. Soedarto, SH, Semarang 50275
Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690

ABSTRACT

Bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.) is one of original fruit plants from Indonesia. Bilimbi fruits contain flavonoid, saponin, triterpenoid and tanin that have ability as antimicrobial. Bacteria was isolated from bilimbi fruits expected to be able produce bioactive compounds which can kill pathogenic bacteria such as *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* which caused Bacterial Leaf Blight (BLB). Bacterial Leaf Blight in Indonesia caused harvest losses of 18 – 36 %. Infection was caused by *X. oryzae* caused the leaf symptoms to turn pale yellow, white, withered, and finally die. The purpose of this research are get bacteria isolate from bilimbi fruits (*Averrhoa bilimbi* L.) and testing bioactive compounds on bacteria isolate from bilimbi fruits which can inhibit *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) growth. This research use methods, that are isolation of bacteria from bilimbi fruits and isolation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, characterization biochemically, inhibition test, and Thin Layer Chromatography. Obtained two bacteria isolate from bilimbi fruits. They are IBW₁ dan IBW₂, inhibition zona of IBW₁ is 0,15 mm and IBW₂ 0,35 mm. Both of them have potential in antibacteria of *X. oryzae* bacteria eventhough in weak catagory. Metabolite secondary compound which play a role in antibacteria of *X. oryzae* is flavonoid compound.

Kata kunci: *antibacteria*, *bilimbi*, *Thin Layer Chromatography*, *X. oryzae*

ABSTRAK

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan salah satu tanaman buah asli Indonesia. Buah belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Bakteri yang diperoleh dari buah belimbing wuluh diharapkan mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat membunuh bakteri patogen seperti bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab penyakit Hawar Daun Bakteri. Serangan HDB di Indonesia menyebabkan kerugian hasil panen sebesar 18 – 36%. Infeksi yang disebabkan oleh *X. oryzae* menimbulkan gejala daun berubah menjadi kuning pucat, putih, layu, dan akhirnya mati. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh isolat bakteri yang terdapat pada buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan menguji potensi isolat bakteri tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) serta mengetahui senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Metode yang digunakan meliputi, isolasi bakteri dari buah belimbing wuluh dan isolasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,

karakterisasi secara biokimia, uji aktivitas antibakteri, dan Kromatografi Lapis Tipis. Diperoleh dua isolat bakteri yang berasal dari buah belimbing wuluh yaitu IBW₁ dan IBW₂. IBW₁ menunjukkan zona hambat sebesar 0,15 mm dan IBW₂ sebesar 0,35 mm. Keduanya memiliki potensi dalam antibakteri *X. oryzae* meskipun dalam kategori lemah. Senyawa metabolit sekunder yang berperan dalam antibakteri *X. oryzae* yaitu senyawa flavonoid.

Kata kunci: antibakteri, belimbing wuluh, Kromatografi Lapis Tipis, *X. oryzae*

PENDAHULUAN

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan salah satu tanaman buah asli Indonesia dan daratan Malaya. Tanaman tersebut banyak ditemui sebagai tanaman pekarangan yang mudah ditanam dan tidak memerlukan perawatan khusus. Menurut Soetanto (1998), tanaman belimbing wuluh yang tumbuh baik dapat menghasilkan 100 – 300 buah/ pohon, seringkali mengalami kebusukan sebelum dimanfaatkan. Buah yang sudah matang harus cepat dipanen karena buah belimbing wuluh mudah sekali gugur dari pohonnya dan mudah membusuk. Kemampuan tanaman ini untuk menghasilkan buah sepanjang tahun tidaklah sebanding dengan pemanfaatannya. Buah belimbing wuluh, mengandung beberapa senyawa kimia yang bermanfaat. Buah belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Lathifah (2008), menambahkan bahwa golongan senyawa aktif yang paling dominan sebagai anti bakteri yaitu flavonoid dan triterpenoid.

Mikroba endofit yang diperoleh dari bagian dalam tanaman seperti buah belimbing wuluh diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya. Senyawa tersebut berupa senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa

bioaktif dan dapat berfungsi untuk membunuh bakteri patogen. Buah belimbing wuluh bersifat asam, menurut Todar (2008), bakteri toleran asam yang menguntungkan mencakup banyak spesies pada genus tertentu seperti *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*.

Permasalahan yang seringkali menjadi kendala utama dalam pertanian khususnya tanaman padi adalah serangan mikroba patogen yang mampu mengakibatkan hasil pertanian menurun drastis. Salah satu penyakit utama pada pertanian padi di Indonesia serta negara Asia lainnya yaitu Hawar Daun Bakteri (*Bacterial Leaf Blight*) atau dikenal pula dengan istilah “kresek” yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Menurut Wahyudi *et al.* (2011), serangan HDB di Indonesia menyebabkan kerugian hasil panen sebesar 21 – 36% pada musim hujan dan sebesar 18 – 28% pada musim kemarau. Infeksi yang disebabkan oleh *X. oryzae* menimbulkan gejala yang khas yakni, serangannya pada tanaman yang masih muda menyebabkan daun berubah menjadi kuning pucat, putih, layu, dan akhirnya mati.

Penggunaan pestisida kimia merupakan upaya yang selama ini dilakukan guna mengatasi gangguan penyakit pada tanaman karena dinilai efektif dan cepat. Namun, di sisi lain diketahui pula penggunaan pestisida kimia berdampak buruk, baik bagi

keamanan konsumen dan lingkungan (Wahyudi *et al.*, 2011). Oleh karena, diperlukan alternatif solusi lain yang dapat menanggulangi gangguan penyakit pada tanaman yang bersifat ramah lingkungan, yakni dengan penggunaan agensia hayati sebagai biokontrol.

Aplikasi pemanfaatan bakteri endofit sebagai agensia hayati terhadap patogen merupakan cara alternatif untuk menekan pertumbuhan patogen sehingga secara tidak langsung dapat meningkatkan hasil pertanian dengan tetap menjaga kesehatan lingkungan. Danielson *et al.* (2007), menambahkan bahwa bakteri mampu memproduksi berbagai antibiotik yang dapat efektif melawan berbagai patogen bakteri dan jamur. Bakteri endofit memiliki keunggulan menghasilkan metabolit sekunder yang dapat membantu pertahanan tumbuhan inang. Senyawa yang dihasilkan juga sama dengan tumbuhan inangnya.

Pemanfaatan senyawa bioaktif yang diperoleh dari isolat bakteri dari suatu tanaman seperti belimbing wuluh sebagai antibakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi merupakan pengendalian yang tidak menimbulkan efek negatif terhadap kehidupan manusia dan lingkungan. Dengan demikian, penggunaan mikroba yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya, dapat digunakan sebagai upaya pengendalian hayati yang lebih ramah lingkungan. Disatu sisi dapat meningkatkan produksi padi, di sisi lain melestarikan lingkungan. Sehingga dari penguraian tersebut menjadi latar belakang dilakukannya penelitian ini.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan selama bulan Januari – Juni 2017. Tempat

penelitian di Laboratorium Bakteriologi Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, gelas beaker, autoklaf, rak tabung, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, pipet tetes, bunsen, mikroskop, jarum ose, *spreader*, pinset, erlenmeyer, penggaris, gelas benda, gelas penutup, kertas cakram, tabung *centrifuge* 15 mL, *centrifuge*, corong pemisah, *rotary evaporator*, *rotary shaker*, plat KLT, chamber, pipa kapiler, UV Vis, timbangan, mortar, sprayer, plastik, cutter, jangka sorong, kamera, alat tulis, masker, sarung tangan dan jas laboratorium.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel daun padi yang menunjukkan gejala penyakit HDB dan sampel daun padi sehat diambil dari persawahan di Tembalang, Semarang, sampel buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) diambil di kawasan kampus UNDIP, medium NA (*Nutrient Agar*), medium NB (*Nutrient Broth*), aquades, etil asetat, methanol, larutan ninhidrin, larutan garam fisiologis, bayclin, spirtus, kapas, kasa, selotip (*wrap cling*), tisu, korek, alkohol 70%, alumunium foil.

Cara Kerja Penelitian

a. Isolasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)

Isolasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Wahyudi (2011) dengan sedikit modifikasi. Daun padi yang menunjukkan gejala HDB permukaan daunnya disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 3 menit, kemudian dipotong - potong dan direndam dalam 20 mL larutan garam fisiologis 0,8% selama 10 menit.

Suspensi bakteri diencerkan hingga 10^{-6} , kemudian disebar menggunakan metode cawan sebar pada media NA. Selanjutnya dilakukan pemurnian koloni dengan metode gores kuadran hingga diperoleh koloni tunggal. Koloni tunggal yang telah diperoleh diremajakan pada media agar miring NA. Koloni *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) pada medium NA akan terlihat bulat, cembung, berwarna kuning, dan berdiameter 1-2 mm.

b. Isolasi Bakteri dari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Isolasi bakteri endofit dari buah belimbing wuluh dilakukan dengan cara mencuci buah belimbing wuluh dengan air mengalir dan disterilisasi dengan alkohol 70% selama 3 menit, kemudian direndam dengan Bayclin selama 20 menit serta dilewatkan pada api bunsen. Buah digerus dan ditambah NaCl fisiologis kemudian suspensi bakteri diencerkan hingga 10^{-6} . Selanjutnya sebanyak 100 μ L ekstrak buah belimbing wuluh dimasukkan ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) pada cawan. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu ruang. Koloni bakteri yang tumbuh pada media isolasi kemudian dilakukan pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan menginokulasikan isolat pada media NA baru dan diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu ruang.

c. Karakterisasi secara Fisiologi dan Biokimia

Karakterisasi secara fisiologi dan biokimia mengikuti aturan pada *Laboratory Manual in General Microbiology* untuk menentukan isolat yang diperoleh termasuk dalam *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* atau tidak. Uji yang dilakukan yaitu

pewarnaan Gram, uji fermentasi karbohidrat, hidrolisis pati, dan uji katalase.

Pewarnaan Gram

Kaca objek disterilisasi dengan alkohol dan ditetesi 1 tetes aquades steril. Koloni bakteri diambil dari media NA diambil sebanyak satu ose, kemudian disuspensikan pada aquades di kaca objek, kemudian di fiksasi diatas api bunsen. Usapan bakteri ditetesi dengan 2 – 3 tetes larutan Gram A selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan. Selanjutnya, ditetesi dengan 2 – 3 tetes larutan Gram B selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan. Selanjutnya, ditetesi lagi dengan 2 – 3 tetes larutan Gram C selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan. Kemudian, ditetesi 2 – 3 tetes larutan Gram D selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan. Hasil pewarnaan Gram yaitu Gram positif sel nampak berwarna ungu, sedangkan Gram negatif sel nampak berwarna merah.

Uji Katalase

Koloni bakteri diambil dari media NA diambil sebanyak satu ose, kemudian digoreskan di atas kaca objek yang kering. Hidrogen peroksida 3% diteteskan sebanyak 2-3 tetes pada usapan bakteri. Apabila terbentuk gelembung udara, maka uji katalase dinyatakan positif. Bakteri aerob memberikan reaksi yang positif terhadap uji katalase sedangkan bakteri anaerob tidak menunjukkan reaksi yang positif.

Uji Hidrolisis Pati

Satu ose isolat bakteri ditanam dengan metode goresan pada medium agar pati. Kultur diinkubasi pada suhu

kamar selama 24 – 48 jam. Larutan lugol diteteskan di sekitar biakan setelah terlihat pertumbuhan koloni dan dibiarkan selama 5 menit. Hasil yang tampak diamati dan dicatat. Uji hidrolisi pati positif terdapat daerah bening pada medium yang mengandung pati setelah penambahan larutan lugol.

Uji Oksidatif/ Fermentatif (O/F)

Isolat bakteri diinokulasikan pada 2 tabung reaksi yang berisi medium Oksidatif/ Fermentatif (O/F) masing – masing satu ose, tabung pertama ditambah parafin cair 0,5 mL dan tabung kedua tanpa ditambah parafin cair. Kultur diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu kamar. Perubahan yang terjadi diamati dan dicatat. Hasil uji O/F yaitu jika tabung yang ditambah parafin cair berwarna kuning dan tabung yang tidak ditambah parafin cair berwarna hijau, bakteri termasuk oksidatif (hasil positif). Jika tabung yang ditambah parafin cair dan tabung yang tidak ditambah parafin cair berwarna kuning, bakteri termasuk fermentatif. Jika tabung yang ditambah parafin cair dan tabung yang tidak ditambah parafin cair berwarna hijau, menunjukkan hasil negatif.

d. Uji Aktivitas Antibakteri *Averrhoa bilimbi* L. terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)

Uji aktivitas antibakteri terhadap *X. oryzae* secara *in vitro* mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Maerani (2014) dengan sedikit modifikasi. Satu ose bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) diregenerasikan pada 5 mL media NB dan isolat bakteri *Averrhoa bilimbi* L. diregenerasikan pada 5 mL media NB, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. 1 mL kultur *Xanthomonas oryzae* pv.

oryzae (Xoo) dicampur dengan 19 mL media *Nutrient Agar* (NA) cair dengan suhu 40°C (konsentrasi 5%) dan dikocok. Kemudian dituang pada cawan petri. Setelah menjadi agar, kertas cakram 7 mm steril ditetesi dengan 15 µL kultur isolat bakteri *Averrhoa bilimbi* L., kemudian diletakkan diatas media NA yang telah berisi isolat bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Medium diinkubasi pada suhu ruang selama 24 – 48 jam dan diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Uji aktivitas daya hambat tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan sebagai kontrol dilakukan uji negatif dengan menggunakan aquadest.

e. Ekstraksi Metabolit Sekunder Bakteri yang Mampu Menghambat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)

Metode ekstraksi metabolit sekunder mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Niyaz (2012) dengan sedikit modifikasi. Isolat bakteri dari buah belimbing wuluh yang memiliki diameter zona hambatan terbaik, ditumbuhkan di dalam dua erlenmeyer 250 mL yang berisi 200 mL media *Nutrient Broth* yang telah steril, kemudian diinkubasi selama 5 hari dengan agitasi 120 rpm pada suhu ruang. Kultur bakteri dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse steril, lalu di sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 25 menit untuk memisahkan bagian pellet dan supernatan, kemudian supernatan diberi etil asetat (rasio 1:2 v/v). Campuran dikocok terus menerus di dalam corong pemisah selama 15 menit, hingga terbentuk tiga lapisan. Lapisan atas diambil dan diuapkan dengan rotary evaporator

untuk mendapatkan ekstrak yang mengandung metabolit sekunder bakteri.

f. Identifikasi Senyawa Bioaktif

Identifikasi senyawa bioaktif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis berdasarkan metode yang dilakukan oleh Wagner, *et al.* (1984) dengan sedikit modifikasi. Ekstrak metabolit sekunder bakteri diambil sedikit dengan spatula dan dilarutkan dengan metanol, kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat. Kedua lempeng tersebut dieluasi menggunakan etil asetat : metanol (10:1). Hasil KLT dikeringkan hingga semua pelarut menguap dan disemprot dengan ninhidrin. Lempeng hasil KLT digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa dengan mengamati dibawah lampu UV 366 nm, kemudian dihitung Rf-nya.

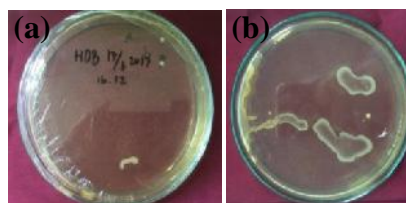
$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Berdasarkan hasil isolasi yang telah dilakukan, diperoleh 3 koloni pada daun padi yang memiliki gejala HDB dan 5 koloni pada daun padi sehat. Pada isolasi bakteri daun padi yang menunjukkan gejala HDB, koloni 1 (HDB₁) memiliki bentuk koloni yang tidak beraturan, berwarna putih kekuningan, dan berlendir, sedangkan koloni 2 (HDB₂) dan koloni 3 (HDB₃) memiliki ciri – ciri yang sama yaitu berbentuk bulat, mengkilap, elevasi *raised*, berwarna putih kekuningan. Pada daun padi yang sehat terdapat 5 koloni. Koloni 1 (SHT₁), koloni 2 (SHT₂), koloni 4 (SHT₄) memiliki ciri – ciri yang sama

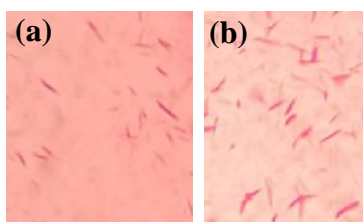
yaitu bentuk koloni tidak beraturan, berwarna bening dengan tepi yang sangat tebal berwarna kuning pucat. Koloni 3 (SHT₃) berbentuk bulat, cembung, tepi rata, dan berwarna kuning. Koloni 5 (SHT₅) berbentuk bulat, berwarna orange dan transparan (Gambar 1). Berdasarkan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa isolat yang diisolasi dari daun padi HDB berbeda dengan isolat yang diisolasi dari daun padi sehat. Isolat yang diisolasi dari daun padi HDB terutama yang HDB₂ dan HDB₃ menunjukkan ciri – ciri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yaitu koloni berbentuk bulat, cembung, permukaan mengkilap, dan berwarna kuning pucat. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Arsyad *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa koloni bakteri pada media NA berbentuk lingkaran, halus, cembung, tidak tembus cahaya, dan warna awalnya kuning pucat kemudian berubah warna menjadi kuning jerami.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri dari daun padi inkubasi 72 jam: (a) daun padi yang menunjukkan gejala HDB dan (b) daun padi sehat

Koloni HDB₁ tidak menunjukkan bahwa koloni tersebut merupakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, sehingga HDB₁ diabaikan. HDB₂ dan HDB₃ tumbuh dengan ciri – ciri tipe pertumbuhannya koloni berbentuk *circular*, berwarna putih kekuningan, pekat, mengkilap, dan tepi rata. Hasil dari pengamatan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000 kali untuk HDB₂ berbentuk basil (batang) dan termasuk Gram negatif, sedangkan HDB₃

diperoleh hasil yang sama yaitu berbentuk basil (batang) dan termasuk Gram negatif (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil pengamatan mikroskopis isolat bakteri (a) HDB₂ dan (b) HDB₃ perbesaran 1000X

Dari hasil pengamatan, isolat HDB₂ dan HDB₃ yang menunjukkan bahwa HDB₂ dan HDB₃ merupakan bakteri *Xanthomonas oryzae* karena, pada medium NA memiliki ciri – ciri koloni berbentuk bulat, mengkilap, berlendir, dan berwarna kuning pucat. Kemudian setelah pewarnaan Gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali termasuk Gram negatif dan berbentuk basil. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan OEPP/EPPO (2007), yang menyatakan bahwa koloni bakteri pada medium NA berbentuk lingkaran, halus, cembung, tidak tembus cahaya, dan warna awalnya kuning pucat. Liu *et al.* (2006) menambahkan bahwa sel bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* mempunyai ciri – ciri berupa sel batang pendek, tidak membentuk spora, dan termasuk Gram negatif.

Penelitian selanjutnya yaitu uji biokimia untuk membuktikan apakah isolat bakteri yang menunjukkan ciri – ciri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* tersebut benar – benar bakteri yang diharapkan dalam penelitian ini. Uji biokimia ini juga dilakukan pada stok kultur bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (HDBR) yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro sebagai pembanding. Karakterisasi secara biokimia mengikuti aturan *Laboratory Manual in General Microbiology* yang meliputi pewarnaan Gram, uji oksidatif/fermentatif (O/F), uji hidrolisis pati, dan uji katalase. Hasil uji menunjukkan bahwa, isolat HDB₂ termasuk Gram negatif, uji oksidatif/fermentatif (O/F) menunjukkan hasil positif, uji hidrolisis pati menunjukkan hasil positif, dan uji katalase juga menunjukkan hasil positif.

Isolat HDB₃ termasuk Gram negatif, uji oksidatif/fermentatif (O/F) menunjukkan hasil negatif, uji hidrolisis pati menunjukkan hasil positif, dan uji katalase juga menunjukkan hasil negatif. Sedangkan kultur pembanding yang merupakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang telah diidentifikasi molekuler termasuk Gram negatif, uji oksidatif/fermentatif (O/F) menunjukkan hasil positif, uji hidrolisis pati menunjukkan hasil positif, dan uji katalase juga menunjukkan hasil positif (Tabel 1).

Tabel 1. Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia isolat HDB₂, HDB₃, dan kultur pembanding

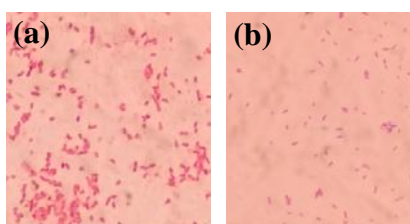
No	Isolat	Pewarnaan Gram	Uji Katalase	Uji Hidrolisis Pati	Uji Oksidasi/Fermentatif
1.	HDB ₂	Negatif	+	+	+
2.	HDB ₃	Negatif	-	+	-
3.	HDBR	Negatif	+	+	+
Refferensi (<i>Bergey's Manual of Determinative</i>)		Negatif	+	+	+

Bacteriology

Berdasarkan hasil isolasi pada medium *Nutrient Agar* dan uji biokimia, HDB₂ mendekati kebenaran sebesar 99% merupakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang diharapkan dalam penelitian ini, sehingga isolat HDB₂ yang digunakan untuk uji daya hambat. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Bergey (1984), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* termasuk Gram negatif, uji oksidatif/fermentatif (O/F) menunjukkan hasil positif, uji hidrolisis pati menunjukkan hasil positif, dan uji katalase juga menunjukkan hasil positif.

Isolasi Bakteri Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

Berdasarkan hasil isolasi yang telah dilakukan, diperoleh 2 isolat yaitu IBW₁ dan IBW₂. Isolat IBW₁ memiliki ciri – ciri bentuk *circular*, elevasi *raised*, permukaan mengkilap, tepi *entire*, dan warna kuning pucat. Isolat IBW₂ memiliki ciri – ciri bentuk *irregular*, elevasi *raised*, permukaan mengkilap, tepi *undulate*, dan warna kuning pucat. Hasil pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 1000 kali yaitu isolat IBW₁ merupakan uniseluler, memiliki bentuk sel basil (batang), dan termasuk dalam Gram negatif. Sedangkan isolat IBW₂ merupakan uniseluler, memiliki bentuk sel basil (batang), dan termasuk dalam Gram positif (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil pengamatan mikroskopis isolat bakteri (a) IBW₁ dan (b) IBW₂ perbesaran 1000X

Uji Aktivitas Antimikroba

Pada uji aktivitas antimikroba, hasil penelitian setelah 24 jam menunjukkan bahwa inkubasi pada pengulangan 1 IBW₁ tidak menunjukkan zona hambat, sedangkan IBW₂ menunjukkan zona hambat sebesar 0,35 mm. Pada pengulangan 2 dan pengulangan 3, IBW₂ tidak menunjukkan zona hambat, sedangkan IBW₁ menunjukkan zona hambat sebesar 0,15 mm (Tabel 2). 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 kriteria tersebut, maka daya hambat (antibakteri) isolat IBW₁ dan IBW₂ tergolong dalam kategori lemah.

Adanya zona hambat tersebut merupakan mekanisme perlawanan isolat IBW₁ dan IBW₂ terhadap *X. oryzae* secara *in vitro* ini merupakan mekanisme antibiosis sebagai upaya penekanan pertumbuhan *X. oryzae*. Pernyataan ini diperkuat oleh Allabouvette *et al.* (2006), bahwa antibiosis merupakan suatu mekanisme yang digunakan biokontrol seperti *Bacillus* sp., *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp., atau *Streptomyces* sp., yang disebabkan oleh kemampuannya dalam memproduksi antibiotik, bakteriosin, enzim pendegradasi dinding sel, dan senyawa volatil lainnya.

Isolat IBW₁ dan IBW₂ memiliki daya hambat yang berbeda, disebabkan karena setiap spesies mikroba memiliki kemampuan antibiosis yang berbeda – beda. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Fitri and Betty (2010), yang menyatakan bahwa variasi daya hambat pada berbagai bakteri disebabkan karena setiap bakteri memproduksi metabolit sekunder yang berbeda. Bos *et al.* (2007), menambahkan bahwa bakteri Gram negatif memiliki membran luar sebagai penghalang selektif yang melindungi bakteri tersebut dari senyawa berbahaya seperti antibiotik dalam lingkungan. Faktor tersebut pula sebagai penyebab bakteri Gram negatif memiliki perlindungan yang lebih baik terhadap senyawa antimikroba, sehingga hanya

beberapa jenis bakteri yang mampu menghambat pertumbuhannya. Namun, bakteri Gram Negatif memiliki dinding sel yang mengandung lemak dan lapisan peptidoglikannya sangat tipis. Sedangkan, bakteri Gram positif mengandung protein dan dinding selnya yang lebih tebal. Hal tersebut, yang membuat pertahanan isolat bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* mampu dihambat oleh isolat IBW₁ dan IBW₂. Metabolit sekunder yang dikeluarkan isolat IBW₂ untuk melawan bakteri patogen *Xanthomonas oryzae* mempunyai kecenderungan lebih besar daripada IBW₁, karena diameter daya hambat yang dikeluarkan oleh IBW₂ lebih besar daripada IBW₁.

Tabel 2. Diameter daya hambat isolat bakteri belimbing wuluh terhadap *Xanthomonas oryzae*

Isolat	Diameter daya hambat (mm)		
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3
IBW ₁	-	0,15	0,15
IBW ₂	0,35	-	-

Identifikasi Senyawa Bioaktif Isolat Bakteri Belimbing Wuluh

Supernatan hasil sentrifugasi kultur IBW₂ diperoleh sebanyak 388 mL dan etil asetat yang ditambahkan sebanyak 776 mL. Saat supernatan dan etil asetat dicampur terjadi reaksi pemisahan dua fase. Fase satu (bagian atas) berwarna bening dan fase dua (bagian bawah) berwarna kuning. Antara fase satu dan fase dua terlihat larutan pada fase dua saling tertarik keatas. Menurut Wardhani dan Nanik (2012), etil asetat digunakan sebagai pelarut karena etil asetat dapat mencari senyawa – senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri, diantaranya flavonoid polihidroksi dan fenol lain. Campuran selanjutnya dikocok terus menerus di dalam corong pemisah/ *separated tunnel*

selama 15 menit, hingga terbentuk tiga lapisan. Hasilnya yaitu lapisan atas berwarna bening, lapisan kedua berwarna kuning, keruh, dan terdapat

buih, lapisan ketiga berwarna kuning. Menurut Nurfadillah dan Waode (2016), fase yang berada di atas adalah senyawa – senyawa yang ikut dalam etil. Etil asetat memiliki fungsi sebagai pelarut sehingga terjadi pemisahan larutan tersebut. Etil asetat berperan dalam menarik semua senyawa metabolit yang terdapat pada kultur bakteri, baik yang bersifat polar maupun non polar. Kemudian lapisan atas diambil dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak yang mengandung metabolit sekunder bakteri dalam bentuk pasta (semi padat). Metabolit sekunder bakteri hasil

evaporasi yaitu sebesar 0,1729 g, berwarna coklat, dan berbentuk pasta.

Identifikasi senyawa bioaktif atau metabolit sekunder dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Plat KLT yang digunakan yaitu Silica Gel F₂₅₄. Berdasarkan hasil KLT dan diamati di bawah sinar UV, terdapat 4 spot yang tampak berflouresens dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol = 10 : 1 dan sampai garis batas atas membutuhkan waktu 5 menit 33 detik. Setelah dihitung nilai Rf-nya diperoleh nilai sebagai berikut: Rf₁ = 0,425; Rf₂ = 0,7; Rf₃ = 0,825; Rf₄ = 0,925. Menurut Gandjar dan Abdul (2007), Rf KLT yang bagus berkisar antara 0,2 - 0,8. Sehingga, nilai Rf yang digunakan yaitu Rf₁ dan Rf₂. Berdasarkan literatur Mursidi (1990), senyawa flavonoid memiliki nilai Rf antara 0,2 – 0,75. Nilai Rf₂ dan Rf₃ hasil KLT senyawa metabolit sekunder isolat bakteri belimbing wuluh (IBW₂) tersebut menunjukkan senyawa flavonoid. Guaijaverin *et al.* (2006) menambahkan, senyawa aktif flavonoid memiliki kemampuan menghambat intercellular adhesion genes *icaA* dan *icaD* (faktor pembentukan biofilm) dan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Selanjutnya, fungsi permeabilitas sel bakteri akan terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang berakibat pada kematian sel bakteri. Pada isolat IBW₂ memiliki senyawa flavonoid yang mampu melawan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sehingga hal tersebut berpotensi sebagai agensi hayati untuk melawan fitopatogen dan demi menjaga kelestarian lingkungan.

SIMPULAN

Diperoleh dua isolat bakteri yang berasal dari buah belimbing wuluh yaitu IBW₁ dan IBW₂. Isolat IBW₁ menunjukkan zona hambat sebesar 0,15

mm dan IBW₂ sebesar 0,35 mm. Keduanya memiliki potensi dalam menghambat bakteri *Xanthomonas oryzae* meskipun dalam kategori lemah. Senyawa metabolit sekunder yang berperan dalam mematikan *Xanthomonas oryzae* yaitu senyawa flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Allaboutvete, C., C. Olivain dan C. Steinberg. 2006. Biological Control of Plant Diseases: the Europan Situation. *Europ. J. Pla. Pathol.* 114: 329-341.
- Bergey, D. H., John G. H., and Noel K. 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA: Library of Congress Cataloging in Publication Data.
- Bos, M.P., V. Robert dan J. Tommassen. 2007. Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane. *Annu. Rev. Microbiol* 61: 191-214.
- Brown. 2012. *Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Micobiology Complete Version Twelfth Edition*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Fitri, L. dan Betty M. B. 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.
- Gandjar, I. G. dan Abdul R. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Guaijaverin, Prabu G. R, Gnanamani A., dan Sadulla S. G. 2006. A plant flavonoid as potential antiplaque agent against Streptococcus mutans. *Journal of Applied Microbiology* 101(2): 487-495.
- Lathifah, Q. A. Y. 2008. *Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa*

- Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) dengan Variasi Pelarut*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN), Malang.
- Liu, Z. K., Arif M., Zhong D.B., Fu B.Y., Xu J.L., Domingo-Rey J., Ali J., Vijayakumar C.H.M., Yu S.B. and Khush G.S. 2006. Complex Genetic Networks Underlying the Defensive System of Rice (*Oryza sativa* L.) to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Proc. Natl Acad. Sci. USA.
- Maerani. 2014. *Bioprospeksi Rizobakteri Endospore-Former Pada Tanaman Padi Sebagai Biokontrol Fitopatogen Xanthomonas Oryzae*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.
- Mursidi. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Universitas Gadjad Mada.
- Niyaz, A. M. I. 2012. Isolation and Identification of Secondary Metabolites Producing Organisms from Marine Sponge. *Discovery* 1 (1): 14-17.
- Nurfadillah, S. C dan Waode R. 2016. Analisis Antioksidan Ekstrak Etil Asetat dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan Menggunakan Metode DPPH (1,1 Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Jurnal Al-Kimia* 1 (4).
- Nursanty, R. dan Iqbar. 2013. Identifikasi Bakteri Endofit Asal Tanaman Belimbing Wuluh. *Jurnal Biologi Edukasi* 1 (5).
- OEPP/EPPO. 2007. *Xanthomonas oryzae*. *Bulletin OEPP/EPPO* 37: 543-553.
- Soetanto, N. E. 1998. *Manisan Buah-buahan 3 Ceremai, Belimbing, Jambu Biji*. Yogyakarta: Kanisius.
- Todar, K. 2008. *Textbook of Bacteriology*. Amerika Serikat: Department of Bacteriology University of Wisconsin.
- Wahyudi, A. T., Siti M., dan Abdjad A. N. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Bakteri Penyebab Hawar Daun pada Padi: Isolasi, Karakterisasi, dan Telaah Mutagenesis dengan Transposon. *Jurnal Makara, Sains* 1 (15): 89-96.
- Wagner, H., Sabine B., and Eva M. Z. 1984. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*.
- Wardhani, L. K dan Nanik S. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera Scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella Flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1 (2): 1-16.