

AKTIVITAS ANTI-FITOPATOGEN HASIL FERMENTASI *Bacillus subtilis* AAF2 PADA PEMILIHAN SUMBER KARBON

ANTI-PHYTOPATHOGENIC ACTIVITY FROM FERMENTATION OF *Bacillus subtilis* AAF2 IN SELECTION OF CARBON SOURCES

Syukria Ikhsan Zam¹, Anthoni Agustien², Syamsuardi², Akmal Djamaan³, Mokhammad Irfan¹, Oksana¹

¹ Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau

² Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas

³ Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Korespondensi : syukria.ikhsan.zam@gmail.com

ABSTRAK

Bacillus subtilis AAF2 adalah bakteri endofit yang memiliki aktivitas anti-fitogen yang tinggi terhadap *Fusarium oxysporum* dan *Sclerotium rolfsii*. Aktivitas anti-fitopatogen dapat ditingkatkan dengan pemilihan sumber karbon yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan sumber karbon terbaik pada hasil fermentasi *Bacillus subtilis* AAF2 terhadap aktivitas anti-fitopatogen. Penelitian dilakukan secara *in vitro* dan sumber karbon yang digunakan adalah glukosa, fruktosa, sukrosa dan laktosa. Parameter pengamatan meliputi jumlah sel *Bacillus subtilis*, fluktuasi pH medium dan daya hambatan terhadap fitopatogen. Hasil penelitian menunjukkan log jumlah sel *Bacillus subtilis* AAF2 berkisar antara 6,11 – 14,74 (CFU ml⁻¹); pH berfluktuasi antara 0,80 – 1,10 dari pH awal medium (7,0); dan daya hambatan terhadap *Fusarium oxysporum* berkisar antara 0,00 – 68,60 %, sedangkan terhadap *Sclerotium rolfsii* berkisar antara 0,00 – 69,40 %. Sumber karbon terbaik dalam penelitian ini adalah glukosa pada waktu fermentasi 48 jam dengan log jumlah sel 14,58 (CFU ml⁻¹); pH 6,7; dan daya hambatan terhadap *Fusarium oxysporum* 68,60 %, serta terhadap *Sclerotium rolfsii* 69,40 %.

Kata kunci: Anti-fitopatogen, *Bacillus subtilis* AAF2, Karbon

ABSTRACT

Bacillus subtilis AAF2 is an endophytic bacterium that has high anti-phytopathogenic activity against *Fusarium oxysporum* and *Sclerotium rolfsii*. Anti-phytopathogenic activity can be increased by choosing the right carbon source. This study aims to find the best carbon source in *Bacillus subtilis* AAF2 fermentation towards anti-phytopathogenic activity. The study was conducted *in vitro* and the carbon sources used were glucose, fructose, sucrose and lactose. The parameters were the cells number of *Bacillus subtilis* AAF2, fluctuations of medium pH and the power inhibition against phytopathogens. The results showed the cells log of *Bacillus subtilis* AAF2 between 6,11 – 14,74 (CFU ml⁻¹); pH fluctuates between 0.80 - 1.10 from the initial pH of the medium (7.0); and the power inhibition against *Fusarium oxysporum*

between 0.00 – 68.60 %, while for *Sclerotium rolfsii* between 0.00 – 69.40 %. The best carbon source in this study was glucose at 48 hours of fermentation time with cell log of 14,58 (CFU ml⁻¹); pH 6.7; and the power inhibition against *Fusarium oxysporum* was 68.60 %, and against *Sclerotium rolfsii* 69.40 %.

Key words : Anti-phytopathogen, *Bacillus subtilis* AAF2, carbon

PENDAHULUAN

Fitopatogen merupakan ancaman terhadap produktivitas pertanian. Pada saat ini, para petani banyak memanfaatkan pestisida sintetis, karena sangat efektif dan dapat diandalkan dalam pengendalian fitopatogen. Pestisida sintetis memiliki efek samping yang kurang baik bagi lingkungan dan makhluk hidup (Shafi *et al.*, 2017).

Salah satu solusi untuk mengatasi hal tersebut di atas adalah dengan menggunakan bakteri yang menguntungkan. Penggunaan bakteri yang menguntungkan pada pertanian dapat membantu melindungi tanaman terhadap fitopatogen. Pada umumnya bakteri menguntungkan berasosiasi dengan tumbuhan sebagai endofit. Bakteri endofit tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan, serta dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme fitopatogen (Chuudhary & Johri, 2009). Pemanfaatan bakteri endofit dalam mengendalikan fitopatogen dapat dilakukan dengan memanfaatkan sel hidup maupun dengan pemanfaatan senyawa bioaktif yang dihasilkan (Baffoni *et al.*, 2015; Mardanova *et al.*, 2017).

Bacillus subtilis merupakan anggota genus *Bacillus* yang dilaporkan menjadi bakteri endofit (Mardanova *et al.*, 2017). Beberapa strain *Bacillus subtilis* memperlihatkan aktivitas anti-fitopatogen terhadap fungi fitopatogen (Baffoni *et al.*, 2015; Mardanova *et al.*, 2017) dan

membuat mereka sebagai kandidat penghasil senyawa anti-fitopatogen yang baik (Baffoni *et al.*, 2015).

Bacillus subtilis AAF2 adalah strain *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari tanaman sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). Filtrat hasil fermentasi strain tersebut dapat menghambat pertumbuhan *Fusarium oxysporum* dengan daya hambatan 60,00 % dan *Sclerotium rolfsii* dengan daya hambatan 58,80 % (Zam, 2018). Berdasarkan hasil penelitian Djamaan *et al.* (2018) strain ini memiliki filtrat hasil fermentasi terbaik pada medium rendaman jagung yang dimodifikasi, dengan daya hambatan 64,30 % terhadap *Fusarium oxysporum* dan 67,10 % terhadap *Sclerotium rolfsii*.

Selain medium fermentasi, hal lain yang berpengaruh dalam aktivitas anti-fitopatogen adalah sumber karbon yang digunakan dalam fermentasi (Kleijn *et al.*, 2009). Informasi tentang sumber karbon terbaik strain *Bacillus subtilis* AAF2 yang mempengaruhi aktivitas anti-fitopatogen terhadap *Fusarium oxysporum* dan *Sclerotium rolfsii* belum tersedia, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan sumber karbon terbaik pada hasil fermentasi *Bacillus subtilis* AAF2 terhadap aktivitas anti-fitopatogen.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 1 Juli – 1 Agustus 2016. Tempat penelitian adalah Laboratorium Bioteknologi Biota Sumatera Universitas Andalas.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat fungi fitopatogen *Fusarium oxysporum*, dan *Sclerotium rolfsii* dari Laboratorium Fitopatologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas, isolat *Bacillus subtilis* AAF2, akuades steril, medium *tryptic soy broth* (17 g pepton; 2,5 g K_2HPO_4 ; 2,5 g glukosa; 5 g NaCl; dan 3 g soypepton L^{-1}), medium rendaman jagung yang dimodifikasi (30 ml air rendaman jagung; 5 g $CaCO_3$; 1 g $FeSO_4$; 2 g $MgSO_4$; 0,1 g $ZnSO_4$; 0,02 g $MnSO_4$; 0,9 g KH_2PO_4 ; dan 5 g Na_2HPO_4 L^{-1}), dan NaCl fisiologis 0,85 %. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet, gelas ukur, Labu Erlenmeyer, Cawan Petri, tabung reaksi, pipet ukur, gelas piala, membran filter 0,2 μm steril, *shaker incubation*, botol vial, *cork borer*, Jarum Ose dan kaliper.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Bahan dan alat tahan panas yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Hasil fermentasi disterilisasi dengan metode filtrasi menggunakan membran filter steril 0,2 μm .

Pembuatan Sumber Inokulum

Pembuatan sumber inokulum dilakukan dengan cara mengambil satu Ose biakan murni dan diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer berisi medium TSB sebanyak 10

mL. Kemudian sebanyak 10 % ($v v^{-1}$) inokulum diinokulasikan ke dalam Labu Erlenmeyer berisi media TSB dengan volume akhir 100 mL dan diinkubasikan pada suhu $27^\circ C$ dengan agitasi 120 rpm selama 8 jam.

Pemilihan Sumber Karbon

Medium yang digunakan adalah media rendaman jagung yang dimodifikasi (Djamaan *et al.*, 2018) dengan sumber karbon yang yaitu: glukosa, fruktosa, sukrosa dan laktosa dengan konsentrasi masing-masing 1,5 % ($b v^{-1}$) dengan pH awal 7. Proses fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan 10 % ($v v^{-1}$) sumber inokulum dengan log jumlah sel 6 (CFU mL^{-1}) ke dalam Labu Erlenmeyer berisi medium rendaman jagung yang dimodifikasi dengan sumber karbon yang berbeda dengan volume akhir 200 ml, selanjutnya diinkubasikan pada suhu $27^\circ C$ dengan agitasi 120 rpm 3 x 24 jam.

Parameter Pengamatan

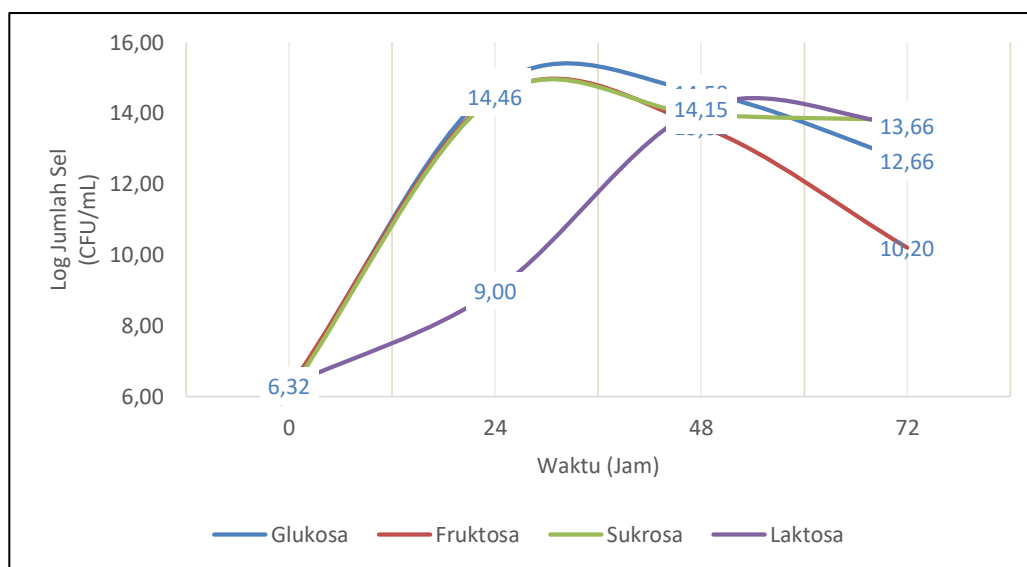
Parameter yang diukur adalah fluktuasi pH dan jumlah sel bakteri diukur setiap 24 jam sekali selama 3 x 24 jam, sedangkan daya hambatan terhadap fitopatogen dilakukan pada waktu fermentasi 48 jam (Valicente *et al.*, 2010). Fluktuasi pH diukur dengan pH meter; perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan metode cawan tuang yang mengacu kepada Cappucino & Sherman (2014); dan daya hambatan pertumbuhan jamur diukur dengan menggunakan metode *food poisoning technique*.

Metode *food poisoning technique* dilakukan dengan cara melakukan filtrasi hasil fermentasi bakteri endofit dengan menggunakan membran filter 0,02 μm steril dan secara aseptis ditampung dalam botol

vial steril. Sebanyak 1 ml filtrat dituangkan dengan menggunakan mikropipet ke dalam Cawan Petri steril, kemudian ditambahkan medium PDA sebanyak 15 ml dan dihomogenkan. Setelah medium tersebut mengeras, selanjutnya diinokulasikan isolat jamur uji (*Fusarium oxysporum* dan

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara secara deskriptif.



Keterangan : CFU = Colony Forming Unit

Gambar 1. Pola pertumbuhan *Bacillus subtilis* AAF2 pada medium rendaman jagung yang dimodifikasi dengan sumber karbon berbeda

Sclerotium rolfsii) dengan diameter 10 mm menggunakan *cork borer*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 x 24 jam. Pertambahan diameter diukur dengan menggunakan kaliper. Daya hambatan pertumbuhan dihitung dengan menggunakan rumus (Kambar *et al.*, 2014):

$$D = \frac{(C-T)}{C} \times 100\%$$

dimana:

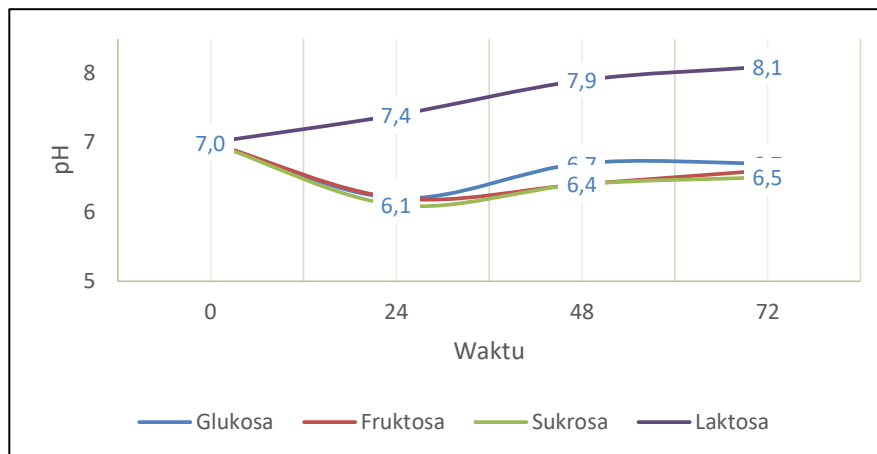
D = Daya hambatan

C = Pertambahan diameter koloni kontrol

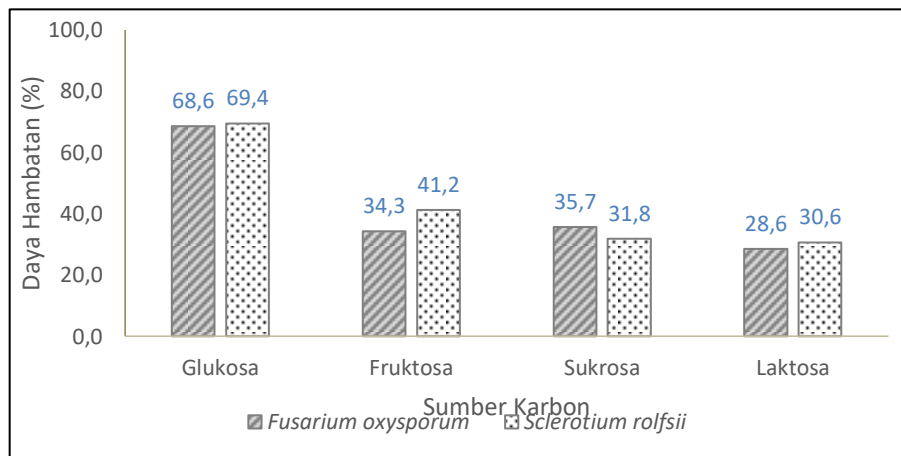
T = Pertambahan diameter koloni perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola pertumbuhan *Bacillus subtilis* AAF2 pada medium dengan sumber karbon glukosa, fruktosa, dan sukrosa memiliki pola yang sama (Gambar 1). Pada medium dengan sumber karbon tersebut, peningkatan pertumbuhan *Bacillus subtilis* AAF2 terjadi pada waktu fermentasi 24 jam, sedangkan pada waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam terjadi penurunan pertumbuhan. Pertumbuhan tertinggi terjadi pada medium dengan sumber karbon glukosa pada waktu fermentasi 24 jam dengan log jumlah sel 14,74 (CFU mL⁻¹), diikuti medium dengan sumber karbon fruktosa 14,48 (CFU mL⁻¹) dan medium



Gambar 2. Perubahan pH medium rendaman jagung yang dimodifikasi selama fermentasi



Gambar 3. Aktivitas anti-fitopatogen *Bacillus subtilis* AAF2 pada sumber karbon yang berbeda

dengan sumber karbon sukrosa 14,46 (CFU mL⁻¹). Pada medium dengan sumber karbon laktosa strain bakteri ini memperlihatkan pertumbuhan yang lambat, dan mengalami pertumbuhan sel sampai waktu fermentasi 48 jam dengan log jumlah sel 14,15 (CFU mL⁻¹). Penurunan pertumbuhan pada medium dengan sumber karbon laktosa baru terjadi pada waktu fermentasi 72 jam (log jumlah sel 13,66 (CFU mL⁻¹)). Hal ini menunjukkan strain *Bacillus subtilis* AAF2 memiliki pertumbuhan terbaik pada medium dengan sumber karbon glukosa. Hasil penelitian Kleijn *et al.* (2009) menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* memiliki pertumbuhan yang baik jika

ditumbuhkan pada medium dengan glukosa sebagai sumber karbonnya.

Medium dengan sumber karbon glukosa, fruktosa, dan sukrosa juga memperlihatkan fluktuasi pH dengan pola yang sama. Penurunan pH terjadi pada waktu fermentasi 24 jam, kemudian meningkat pada waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam, sedangkan pada medium dengan sumber karbon laktosa, terjadi peningkatan pH medium sejak waktu fermentasi 24 jam sampai 72 jam (Gambar 2). Penurunan pH pada medium dengan sumber karbon glukosa, fruktosa, dan sukrosa menunjukkan strain bakteri ini menghasilkan metabolit yang bersifat asam pada awal proses fermentasi (24 jam).

Peningkatan pH pada medium dengan ketiga sumber karbon tersebut pada waktu fermentasi 48 jam dan 72 jam dapat diakibatkan oleh asam-asam organik yang dihasilkan dari proses fermentasi dimetabolisme menjadi metabolit-metabolit yang bersifat basa. Strain *Bacillus subtilis* AAF2 memiliki kecenderungan menghasilkan metabolit-metabolit yang bersifat basa, jika ditumbuhkan pada medium rendaman jagung yang dimofikasi dengan sumber karbon laktosa. Hal tersebut ditunjukkan oleh peningkatan pH medium yang diukur (Gambar 2). Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil yang diperoleh oleh Wang *et al.* (2011). Penelitian Wang *et al.* (2011) memperlihatkan pH medium cenderung menurun pada medium dengan sumber karbon glukosa selama proses fermentasi.

Medium dengan sumber karbon glukosa memiliki aktivitas anti-fitopatogen yang lebih tinggi terhadap kedua jamur fitopatogen, jika dibandingkan dengan sumber karbon lainnya (68,6 % terhadap *Fusarium oxysporum* dan 69,4 % terhadap *Sclerotium rolfsii*), diikuti oleh fruktosa (34,3 % terhadap *Fusarium oxysporum* dan 41,2 % terhadap *Sclerotium rolfsii*), kemudian sukrosa (35,7 % terhadap *Fusarium oxysporum* dan 31,8 % terhadap *Sclerotium rolfsii*), dan yang paling rendah adalah laktosa (28,6 % terhadap *Fusarium oxysporum* dan 30,6 % terhadap *Sclerotium rolfsii*) (Gambar 3). Menurut Datta & Kothary (1993) glukosa merupakan sumber karbon umum yang baik bagi pertumbuhan mikroba, dan ikut serta dalam sintesis beberapa metabolit sekunder. Hal ini juga ditemukan oleh El-Banna (2006) dan Mursiasih & Bayu (2016). Martin (1977) menyatakan glukosa dapat meningkatkan penyerapan fosfat, dan fosfat diketahui

mengendalikan produksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibiotika. Pada beberapa mikroba pemanfaatan karbohidrat sederhana (monosakarida atau disakarida) dapat meningkatkan pertumbuhan, akan tetapi menurunkan produksi metabolit sekunder (Stanbury *et al.*, 2003), seperti pada actinomycetes, glukosa dilaporkan dapat merepresi produksi metabolit sekunder (Demian, 1989).

KESIMPULAN

Sumber karbon terbaik dalam penelitian ini adalah glukosa pada waktu fermentasi 48 jam dengan **log** jumlah sel **14,58** (CFU ml⁻¹); pH 6,7; dan daya hambatan terhadap *Fusarium oxysporum* 68,60 %, serta terhadap *Sclerotium rolfsii* 69,40 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Direktur LPDP Kementerian Keuangan RI atas Beasiswa Disertasi yang diberikan, sehingga penelitian ini bias terlaksana. Terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Universitas Andalas atas Hibah Guru Besar yang turut mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., Biavati, B. & Di Gioia, D. (2015). Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in Durum Wheat. *BMC Microbiology*, 15, 242. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4763-5>

- Cappucino, J. G. & N. Sherman. (2014). *Microbiology : A laboratory manual*. Boston: Pearson Education.
- Chuudhary, D. K. & Johri, B. N. (2009). Interaction of *Bacillus* spp. and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Ressearch*, 164, 493-513.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Datta, A. R. & Kothary M. H. (1993). Effects of glucose, growth temperature, and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3495-3497.
- Demian, A. L. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In S. Shapiro (Ed). *Regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*. pp. 127-134. Boca Raton: CRC Press.
- Djamaan, A., Agustien, A., Zam, S. I., Jannah, M., Lalfari, R. S., Aldi, Y., Dewi, A. P. & Suci, R. P. (2018). Selection of medium for biopesticides fermentation process by *Bacillus subtilis* AAF2 UAAC20701. *International Journal of Pharmacy*, 9(8), 21-26.
<https://doi.org/10.7897/2230-8407.098158>
- El-Banna, N. (2006). Effect on carbon source on the antimicrobial activity of *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium xerosis*. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 833-835.
<https://doi.org/10.5897/AJB05.377>
- Kambar, Y., Manasa, M., Vivek, M. N. & Kekuda, P. T. R. (2014). Inhibitory effect of some plants of Western Ghats of Kartanaka against *Colletotrichum capsici*. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(2), 76-82.
<http://dx.doi.org/10.4314/star.v3i2.10>
- Kleijn, R. J., Buescher, J. M., Chat, L. L., Jules, M., Aymerich, S. & Sauer, U. (2009). Metabolic fluxes during strong carbon catabolite repression by malate in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 1587-1596.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061747>
- Mardanov, A.M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., Bogomolnaya, L. M. & Sharipova, M. R. (2017). *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agricultural Science*, 8, 1-20.
<https://doi.org/10.4236/as.2017.81001>
- Martin, J. F. (1977). Control of antibiotic synthesis by phosphate. In T. K. Ghose, A. Fiechter & N. Blakebrough (Eds). *Advanced in biochemical engineering vol. 6*. pp. 105-127. Berlin: Springer.
- Mursisah, T. & Bayu, A. (2016). Carbon source optimization for antibiotic production AAPTOS-associated bacteria. *Marine Research in Indonesia*, 40(2), 79-84.
<https://dx.doi.org/10.14203/mri.v40i2.63>
- Shafi, J., Tian, H. & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant

pathogens: A review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>

Stanbury, P. F., Whitaker, A. & S. J. Hall. (2003). *Principles of fermentation technology 2nd edition*. Oxford: Butterworth Heinemann.

Valicente, F. H., Tuelher, E. S., Leite, M. I. S., Freire, F. L. & Vieira, C. M. (2010). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 9(1), 1-11.
<https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v9n1p1-11>

Wang, Y., Fang, X., Cheng, Y. & Zang, X. (2011). Manipulation of pH shift to enhance the growth and antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-9.
<http://dx.doi.org/10.1155/2011/672369>

Zam, S. I. (2018). Keanekaragaman bakteri endofit dan potensinya untuk menghasilkan biopestisida. *Disertasi*. Padang: FMIPA Universitas Andalas.