



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **AKTIVITAS ANATAGONISTIK BAKTERI ISOLAT UBCR-036 DAN UBCF-013 PADA BERBAGAI PH SELAMA KO-KULTUR DENGAN JAMUR COLLETOTRICHUM GLOEOSPROIDES**

**SKRIPSI**



**WINDY SAPUTRA  
1110212041**

**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2015**

**AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI ISOLAT UBCR-036  
DAN UBCF-013 PADA BERBAGAI pH SELAMA KO-KULTUR  
DENGAN JAMUR *Colletotrichum gloeosporioides***

**SKRIPSI**

**OLEH**

**WINDY SAPUTRA**

**1110212041**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Pertanian**

**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2015**

**AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI ISOLAT UBCR-036  
DAN UBCF-013 PADA BERBAGAI pH SELAMA KO-KULTUR  
DENGAN JAMUR *Colletotrichum gloeosporioides***

**SKRIPSI**

Oleh :

**WINDY SAPUTRA**  
1110212041

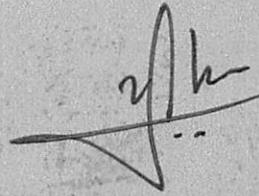
**MENYETUJUI :**

**Dosen Pembimbing I,**



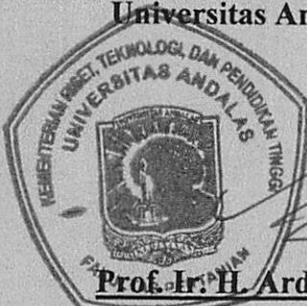
**Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP**  
NIP. 196802021992031003

**Dosen Pembimbing II,**



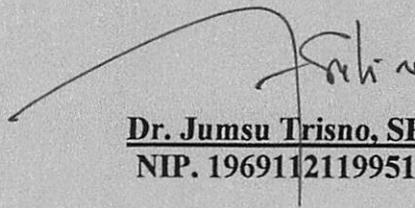
**Dr. Yusniwati, SP, MP**  
NIP. 197012172000122001

**Dekan  
Fakultas Pertanian  
Universitas Andalas,**



**Prof. Ir. H. Ardi, MSc.**  
NIP. 195312161980031004

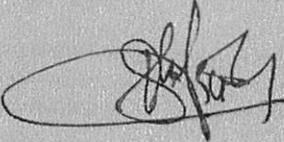
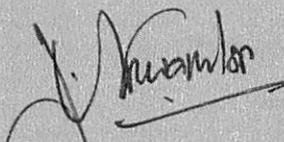
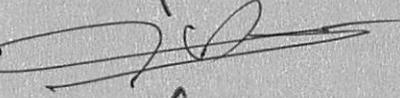
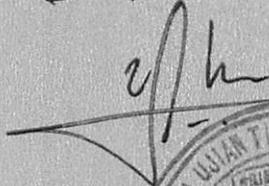
**Ketua  
Program Studi Agroekoteknologi  
Fakultas Pertanian  
Universitas Andalas,**



**Dr. Jumsu Trisno, SP, MSi.**  
NIP. 196911211995121001

Skripsi ini telah diuji dan dipertahankan di depan Sidang Panitia Ujian Sarjana  
Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang pada tanggal 09 Juli 2015.

---

No.	NAMA	TANDA TANGAN	JABATAN
1	Dr. Ir. Istino Ferita, MS		Ketua
2	Nurwanita Ekasari Putri, SP. M.Si		Sekretaris
3	Dr. Ir. Ujang Khairul, MP		Anggota
4	Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP		Anggota
5	Dr. Yusniwati, SP. MP		Anggota

---





Alhamdulillahilalamin, puji syukur saya haturkan kepada Allah SWT karena atas rahmat dan karunia-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini dan tidak lupa shalawat beriring salam kepada baginda Rasulullah SAW yang telah menghantarkan umat manusia dari jaman yang penuh kebodohan ke jaman yang penuh ilmu pengetahuan seperti sekarang ini.

Rasa terimakasih yang sebesar-besarnya juga saya haturkan kepada mutiara-mutiara paling indah yang dikirimkan oleh Allah kepadaku, yaitu kedua orangtuaku Alwin Syahril dan Helmawati. Terimakasih atas segala dukungan yang kalian berikan, aku tidak akan pernah bisa membalas jasa mama dan papa. Kepada ketiga adikku, Ira Winda Fajrin semangat dalam menempuh semester 3 di Strata 1 Fakultas Farmasi Universitas Andalas, semoga studinya cepat diselesaikan, kemudian Nesia Rizki Wanda selamat menempuh pendidikan SMA, dan si kecil Alysa Nirwana tetap semangat dalam menempuh pendidikan di tingkat akhir SMP. Semoga kita menjadi anak yang berbakti dan berguna kepada kedua orangtua kita.

Tak lupa juga kepada kedua orangtuaku di kampus sekaligus dosen pembimbing selama studi, bapak Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP, sosok yang tegas dan disiplin, terimakasih telah mengajarkan hal-hal luar biasa selama ini, ibu Dr. Yusniwati, SP, MP yang selalu memberi semangat dan juga ibu Ir. Lusi Maira, M.Agr.sc yang membimbingku selama empat semester di awal perkuliahan.

Kepada yang spesial, kedua sahabatku Rizki Adeline Siregar dan Ibnu Tarmizi. Terimakasih atas asam, manis, pahit pertemanan yang kalian berikan. Selamat menjalani kehidupan yang baru dan semoga kita dipertemukan lagi di dimensi waktu yang lain.

Tak akan lupa kepada kakak mentor paling baik, kak Siti Nur Aisyah. Terimakasih atas bimbingan kakak selama ini, aku hanya bisa mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya. Semoga pendidikan doktornya cepat selesai dan segera menikah.

Kepada teman-teman seperjuangan : Fadil, dwi, aulia, wawan, ridwan, angga, meldy, gudhi, benny, isil, nia, ayu, mela, merry, imel, loko, sardi, khairul, kak yora, mbak put Kemudian kepada biotechnology group, tim protomik : bang hafid, bang eko, dan Fanny "tatak fanny, tim genomie : Rani "tatak lani", Ira "Tatak ila" cepat mengusul ya, Kakak paling kece kak Elly Syafriani semoga pendidikan doktornya juga cepat selesai, kemudian kak sulas, bg rhenly, kak cai, kak icin, Ifan, Helmi, Retmi, Sonia, Melva, Rafna, Welly, Wira dan bang Fadli, bu Eri, kak Ami, kak isil, bang rian, bu lily, dan yang belum disebutkan namanya serta kepada Agroekoteknologi 2011, plant breeder 2011 dan keluarga besar FYWC.

## **BIODATA**

Penulis dilahirkan di Padangsidempuan, Sumatera Utara pada tanggal 25 Juni 1993 sebagai anak pertama dari 4 bersaudara, dari pasangan Alwin Syahril dan Nelmawati. Penulis menempuh pendidikan di TK Al-Musyarafah tahun 1998-1999, sekolah dasar di SDN 200110 Padangsidempuan pada tahun 1999-2005, sekolah menengah pertama di SMPN 1 Padangsidempuan pada tahun 2005-2008, sekolah menengah atas di SMAN 2 Padangsidempuan pada tahun 2008-2011. Pada tahun 2011 penulis berhasil diterima di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat melalui jalur SNMPTN tertulis.

Penulis

W.S

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur disampaikan ke hadirat Allah yang maha kuasa karena atas rahmat dan izin-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawa kita ke dunia yang penuh ilmu pengetahuan seperti saat sekarang ini. Skripsi ini berjudul “Aktivitas Antagonistik Bakteri Isolat UBCR-036 Dan UBCF-013 Pada Berbagai pH Selama Ko-kultur dengan Jamur *Colletotrichum gloeosporioides*”. Pembuatan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk melakukan penelitian dan menyelesaikan studi S1 dengan bidang utama mata kuliah Biologi Molekuler Program Studi Agroekoteknologi bidang minat Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP dan Dr. Yusniwati, SP. MP selaku dosen pembimbing dan pendamping yang telah banyak memberikan bimbingan juga saran dan terima kasih kepada Siti Nur Aisyah, SP yang telah memberikan bimbingan dan saran selama pembuatan skripsi ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini bisa bermanfaat bagi penulis dan pihak-pihak yang membacanya dan menggunakannya sebagai referensi.

Padang, Juli 2015

W.S.

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
ABSTRAK .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
C. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
A. Penyakit Antraknosa pada Cabai.....	4
B. Potensi Agen Hayati .....	5
C. Bakteri Antagonis dan Mekanismenya.....	6
D. Studi Proteomik dan Analisis Profil Protein.....	7
BAB III METODE PENELITIAN .....	10
A. Waktu dan Tempat.....	10
B. Alat dan Bahan.....	10
C. Metode Penelitian .....	10
D. Prosedur Pelaksanaan .....	11
1. Persiapan Alat dan Bahan.....	11
2. Peremajaan Isolat Jamur dan Bakteri .....	12
3. Uji Antagonis Bakteri terhadap Jamur secara <i>in-vitro</i> pada Ber- bagai pH.....	12
4. Ekstraksi Protein Ekstraseluler dan Intraseluler.....	14
5. SDS PAGE .....	16
E. Pengamatan.....	16

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	18
A. Daya Hambat Bakteri Antagonis terhadap Jamur <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	18
B. Uji Antagonis Media Cair atau Ko-kultur .....	23
C. Profil Protein Bakteri Antagonis pada Berbagai Level pH Selama proses Interaksinya dengan Jamur <i>C. gloeosporioides</i> .....	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	33
A. Kesimpulan.....	33
B. Saran .....	33
DAFTAR PUSTAKA .....	34
LAMPIRAN .....	39

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Komposisi gel SDS PAGE untuk dua gel .....	15
2. Komposisi pembuatan kurva standar BSA .....	17
3. Kadar protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCR-036 .....	26
4. Kadar protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCR-036 .....	26
5. Pita protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCF-013 .....	29
6. Pita protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCR-036 .....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Jadwal penelitian.....	39
2. Pembuatan media .....	40
3. Daya hambat (%) bakteri UBCR-036 dan bakteri UBCF-013 terhadap jamur <i>C. gloeosporioides</i> pada berbagai perlakuan pH pada media padat.....	41
4. Massa miselia jamur <i>C. gloeosporioides</i> pra ko-kultur dan pasca ko-kultur dengan isolat bakteri UBCR-036 dan bakteri UBCF-013 .....	42

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Bagan alir kegiatan penelitian.....	11
2. Skema uji antagonis bakteri terhadap pertumbuhan jamur <i>C. gloeosporioides</i> secara <i>in-vitro</i> .....	13
3. Daya hambat isolat bakteri UBCR-036 terhadap jamur <i>C. gloeosporioides</i> pada berbagai level pH .....	18
4. Uji antagonis bakteri UBCR-036 dengan jamur <i>C. gloeosporioides</i> di media padat pada 8 HSA.....	19
5. Daya hambat isolat bakteri UBCF-013 terhadap jamur <i>C. gloeosporioides</i> pada berbagai level pH .....	20
6. Uji antagonis bakteri UBCF-013 dengan jamur <i>C. gloeosporioides</i> di media padat pada 8 HSA.....	20
7. Diagram massa miselia jamur <i>C. gloeosporioides</i> sebelum dan sesudah ko-kultur dengan isolat bakteri UBCR-036.....	24
8. Diagram massa miselia jamur <i>C. gloeosporioides</i> sebelum dan sesudah ko-kultur dengan isolat bakteri UBCF-013 .....	24
9. Kurva standar BSA .....	25
10. Visualisasi SDS PAGE protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCF-013 pada berbagai level pH.....	28
11. Visualisasi SDS PAGE protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCR-036 pada berbagai level pH.....	30

# AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI ISOLAT UBCR-036 DAN UBCF-013 PADA BERBAGAI pH SELAMA KO-KULTUR DENGAN JAMUR *Colletotrichum gloeosporioides*

## ABSTRAK

Penelitian mengenai Aktivitas Antagonistik Bakteri Isolat UBCR-036 dan UBCF-013 pada Berbagai pH Selama Ko-kultur dengan Jamur *Colletotrichum gloeosporioides* telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang mulai dari bulan Oktober 2014 sampai April 2015. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan pH terbaik dari isolat UBCR-036 dan UBCF-013 dalam menekan pertumbuhan jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan untuk mendapatkan protein intraseluler serta ekstraseluler pada berbagai pH selama ko-kultur antara isolat bakteri UBCR-036 dan UBCF-013 dengan jamur *Colletotrichum gloeosporioides*. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen yaitu menguji aktivitas antagonis dari kedua isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan jamur di media padat dan cair dan deskriptif untuk menjelaskan pola pita protein yang dihasilkan oleh bakteri selama interaksinya dengan jamur. Hasil percobaan menunjukkan bahwa pada uji antagonis media padat, bakteri isolat UBCR-036 menghasilkan persentase daya hambat tertinggi pada pH 6 dengan persentase 25,20 % pada 8 HSA dan pada pH 5 untuk isolat UBCF-013 dengan persentase 19,68% pada 4 HSA. Pada media cair, kedua isolate bakteri memberikan daya hambat tertinggi terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* di pH 7 yaitu 96,43% untuk bakteri UBCR-036 dan 96,09% untuk bakteri UBCF-013. pita protein yang kemungkinan terkait dengan aktivitas antagonistik yaitu pita protein ukuran sekitar 40 dan 58 kDa untuk UBCF-013 dan pita protein ukuran sekitar 120, 55 dan 40 kDa untuk UBCR-036.

Kata Kunci : *Colletotrichum gloeosporioides*, bakteri antagonis, aktivitas antijamur

**ANTAGONISTIC ACTIVITY BACTERIA ISOLATE UBCR-036  
AND UBCF-013 in VARIOUS pH DURING CO-CULTURE  
WITH *Colletotrichum gloeosporioides***

**ABSTRACT**

Research on Bacterial Isolates antagonistic activity UBCR-036 and UBCF-013 at various pH During co-culture with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* have been carried out in the Laboratory of Biotechnology Faculty of Agriculture, University of Andalas Padang start of the month of October 2014 to April 2015. This study aims to get the best pH of isolates UBCR-036 and UBCF-013 in suppressing the growth of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* to get extracellular and intracellular proteins as well as at various pH during the co-culture between bacterial isolates UBCR-036 and UBCF-013 with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. The method used is an experiment that is testing the antagonistic activity of two isolates of bacteria to inhibit the growth of fungi in solid and liquid media and descriptive to explain the pattern of protein bands produced by bacteria during its interaction with the fungus. The results showed that the test antagonist solid media, bacterial isolates UBCR-036 produces the highest percentage of inhibition at pH 6 with a percentage of 25.20% on 8 HSA and at pH 5 to isolate UBCF-013 with a percentage of 19.68% on 4 HSA. In the liquid medium, both bacterial isolates provide the highest inhibition of the growth of fungi *Colletotrichum gloeosporioides* at pH 7 is 96.43% for bacteria UBCR-036 and 96.09% for bacteria UBCF-013. protein bands that might be associated with antagonistic activity of the protein band size is about 40 and 58 kDa for UBCF-013 and the size of the protein band of about 120, 55 and 40 kDa for UBCR-036

**Keywords :** *Colletotrichum gloeosporioides*, antagonist bacteria, antifungal activity.

# BAB I PENDAHULUAN

## A. Latar Belakang

Antraknosa adalah salah satu penyakit yang paling berperan dalam penurunan produktivitas tanaman cabai selain layu bakteri dan kuning keriting. Penyakit ini disebabkan oleh cendawan *Colletotrichum* spp. yang dapat menyebabkan penurunan produksi sebesar 45-60% (Hidayat *et al.*, 2004). Penyakit antraknosa ini sulit dikendalikan karena infeksi patogennya bersifat laten dan sistemik. Upaya pengendalian yang sudah dilakukan saat ini diantaranya dengan penggunaan fungisida sintetis dan pemanfaatan agen hayati, namun penggunaan fungisida sintetis lebih banyak digunakan. Penggunaan fungisida sintetis sudah sangat efisien, hanya saja masalah keamanannya terhadap lingkungan yang kemudian ditentang keras. Penggunaan fungisida sintetis yang berlebihan mengakibatkan sejumlah dampak buruk seperti resiko bahaya bagi kesehatan manusia dan hewan, pencemaran lingkungan, peningkatan resistensi patogen, dan munculnya hama sekunder.

Untuk mengurangi kecenderungan aplikasi fungisida sintetis ini, perlu dikembangkan suatu teknik pengendalian yang lebih aman, yakni melalui pemanfaatan agen hayati. Pengendalian hayati merupakan upaya pengendalian populasi patogen dengan memanfaatkan organisme lain yang bersifat antagonis terhadap patogen target. Pengendalian dengan agen hayati seperti bakteri antagonis dinilai dapat menurunkan dampak buruk akibat penggunaan fungisida sintetis. Pengendalian secara biologis ini dianggap cukup potensial untuk dikembangkan karena sifat racunnya cenderung lebih spesifik, tidak merusak lingkungan, dan tidak menimbulkan efek beracun bagi organisme lain.

Dalam pengendalian biologis ini, organisme yang paling sering dimanfaatkan sebagai agen hayati adalah dari golongan mikroorganisme, misalnya bakteri. Penggunaan bakteri lebih efisien jika dibandingkan dengan mikroorganisme lain karena pertumbuhan bakteri yang cepat sehingga dapat menghemat waktu dan tenaga. Sejumlah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Streptomyces* telah banyak digunakan sebagai agen biokontrol bagi patogen tanaman. Seperti yang dilaporkan oleh Abidin *et al.* (2015) bahwa isolat bakteri *Bacillus* sp. (UB-ABS1) dan bakteri *Pseudomonas* sp. (UB-PF5) dapat menghambat pertumbuhan jamur *Sclerotium rolfsii* dengan

persentase daya hambat sebesar 52.83% dan 37.98% pada 4 HSA (hari setelah aplikasi). Raharini *et al.* (2012) melaporkan bahwa bakteri *Streptomyces* sp. dapat menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* dengan persentase daya hambat sebesar 82% pada 4 HSA. Dalam proses pengembangannya, pemanfaatan agen biokontrol bakteri ini umumnya membutuhkan berbagai upaya optimasi kondisi lingkungan, salah satunya pH, guna memperoleh efek penekanan yang maksimal.

Raaijmakers (2002) mengemukakan bahwa beberapa faktor abiotik seperti pH dan temperatur mempunyai pengaruh besar terhadap produksi senyawa antimikroba dari bakteri. Pada studi lain juga dinyatakan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. memperlihatkan daya hambat tertinggi terhadap jamur *Rhizoctonia solani* pada pH 7 (Islam *et al.*, 2009). Hasil serupa juga dinyatakan oleh Ahlem *et al* (2012) dimana pH berkisar antara 7.5-10 merupakan pH optimum bagi bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* dalam menekan pertumbuhan jamur *Botrytis cinerea*.

Riwany (2012) dan Yani (2012) telah menguji beberapa isolat bakteri rizosfer yang diisolasi dari perakaran bawang dan filoplan yang diisolasi dari daun sawi secara *in vitro* terhadap jamur penyebab antraknosa *C. gloeosporioides* dan diperoleh isolat yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol yaitu bakteri rizosfer strain UBCR-036 dan bakteri filoplan strain UBCF-013. Namun, kemampuan antagonis kedua bakteri ini masih belum maksimal sehingga perlu dioptimasi lebih lanjut guna mendapatkan kondisi lingkungan yang mendukung daya hambatnya, yakni melalui modifikasi pH. Modifikasi ini, diduga dapat memicu terjadinya perubahan mekanisme di dalam sel bakteri yang selanjutnya mendorong peningkatan kemampuan antagonisnya terhadap jamur patogen. Modifikasi pH yang diberikan, diharapkan dapat meningkatkan proses metabolisme bakteri tersebut seperti produksi senyawa antijamur, dimana produksi senyawa tersebut juga dipengaruhi oleh jenis bakteri dan kondisi tekanan yang dihadapi oleh bakteri tersebut baik oleh lingkungan maupun dengan adanya keberadaan mikroorganisme lain yang mengganggu.

Untuk melihat pengaruh yang dihasilkan dari modifikasi ini terhadap bakteri tersebut, dibutuhkan suatu pendekatan berbasis biologi molekuler yakni proteomik. Oleh karena itu juga perlu dilakukan pengujian antagonis bakteri terhadap jamur di media cair atau ko-kultur, karena senyawa antijamur akan lebih banyak dikeluarkan saat bakteri dan jamur berinteraksi secara langsung di media

cair jika dibandingkan dengan interaksinya di media padat dan informasi mengenai protein intraseluler maupun ekstraseluler dapat diperoleh melalui ko-kultur.

Proteomik merupakan suatu kajian yang dilakukan secara molekular terhadap keseluruhan protein yang dihasilkan dari ekspresi gen di dalam sel, terutama mengenai struktur beserta fungsinya. Dengan menggunakan teknik ini, protein dalam suatu sampel dapat dipisahkan, diidentifikasi, dan diukur berdasarkan berat molekulnya (Anderson dan Anderson, 2005). Selain itu, proteomik juga dapat memberikan informasi tentang kehadiran protein serta pengukuran kuantitasnya di dalam suatu sampel biologis (Jamsari, 2013).

Dengan menggunakan pendekatan proteomik ini, perubahan di dalam sel bakteri akibat adanya modifikasi pH dapat ditelusuri dengan mengamati ekspresi protein-protein yang terlibat selama proses antagonisnya dengan jamur. Perbedaan ekspresi protein tersebut akan tergambar bila dua kondisi yang berlawanan dibandingkan satu sama lain. Dalam hal ini, kondisi yang dibandingkan adalah bakteri yang ditumbuhkan bersama jamur dan tanpa jamur. Atas dasar latar belakang inilah, telah dilakukan penelitian yang berjudul “**Aktivitas Antagonistik Bakteri Isolat UBCR-036 dan UBCF-013 Pada Berbagai pH Selama Ko-kultur dengan Jamur *Colletotrichum gloeosporioides***”.

## **B. Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan pH terbaik bagi isolat UBCR-036 dan UBCF-013 dalam menekan pertumbuhan jamur *Colletotrichum gloeosporioides* selama ko-kultur.

## **C. Manfaat**

Manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai pH optimum yang dibutuhkan oleh bakteri isolat UBCR-036 dan UBCF-013 dalam menekan pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara maksimal serta mekanisme seluler yang mendukung kemampuan antagonis tersebut.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Penyakit Antraknosa Pada Cabai

Antraknosa pada cabai disebabkan oleh genus *Colletotrichum*, yang digolongkan menjadi enam spesies utama yaitu *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. dematium*, *C. capsici* dan *C. coccodes* (Kim *et al.*, 1999); *C. gloeosporioides* dan *C. acutatum* menyebabkan kerusakan pada buah dan kehilangan hasil paling besar (Yoon, 2003). Di Indonesia, patogen antraknosa yang paling banyak dijumpai menyerang tanaman cabai adalah *C. capsici* (Syd and Bisb) dan *C. gloeosporioides* (Penz) Sacc. Populasi *C. gloeosporioides* di lapangan 5-6 kali lebih banyak daripada populasi *C. capsici* dan menyebabkan kerusakan lebih parah (Suryaningsih *et al.*, 1996). Penyebaran penyakit antraknosa ini tidak hanya terjadi melalui sentuhan antara tanaman saja melainkan juga karena percikan air, angin, maupun melalui vektor. Penyakit ini dapat terjadi kapan saja, terutama bila curah hujan tinggi (Duriat, 1990). Dari sekian banyak spesies *Colletotrichum*, *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan spesies yang paling banyak menginfeksi tanaman cabai (Syukur, 2007).

Serangan akut dari patogen ini dapat menyebabkan penurunan panen hingga 75% (Shanty, 2009). Umumnya, gejala infeksi dari jamur *Colletotrichum gloeosporioides* tidak terlihat secara jelas di awal pertumbuhan tanaman cabai. Tetapi, pada serangan yang parah dan kondisi lingkungan yang mendukung akan terlihat gejala infeksi pada awal pertumbuhan cabai seperti kecambah gagal tumbuh bahkan mati, dan kecambah tumbuh kerdil karena batang bawah atau leher akarnya membusuk dan mengering. Gejala lainnya juga tampak pada daun, ranting dan buah. Daun dan ranting menjadi kering dan busuk dengan warna cokelat kehitaman (Duriat *et al.*, 2007). Sedangkan pada buah gejala yang terlihat antara lain adanya bintik-bintik berwarna kehitaman yang agak melekek dan menyebabkan buah menjadi mengerut, kering, membusuk dan jatuh.

*C. gloeosporioides* umumnya mempunyai konidium hialin berbentuk silinder dengan ujung-ujung tumpul, kadang-kadang berbentuk agak jorong dengan ujung agak membulat dengan pangkal yang agak sempit terpancung, tidak bersekat, berinti satu, panjang 9 – 24 x 3 - 6  $\mu\text{m}$ , terbentuk pada konidiofor seperti fialid berbentuk silinder, hialin berwarna agak kecoklatan. Penjelasan gejala penyakit antraknosa ditambahkan lagi oleh Pawirosoemardjo (1999) bahwa gejala

yang tampak yaitu adanya bercak coklat kehitaman, tepi daun menggulung merupakan gejala serangan *Colletorichum*. Pada daun umur lebih dari 10 hari terdapat bercak coklat dengan halo warna kuning, selanjutnya bercak tersebut berlubang. Serangan *C. gloeosporioides* pada daun muda menimbulkan bercak berwarna coklat kehitaman pada bagian tengahnya, yang berturut-turut diikuti oleh mengeriputnya lembaran daun, timbulnya busuk kebasahan pada bagian yang terinfeksi dengan akibat yang lebuah jauh gugurnya daun. Pada daun tua (umur daun lebih dari 10 hari) serangan *C. gloeosporioides*, bercak daun berwarna coklat dengan warna kuning dan permukaan daun menjadi kasar. Serangan lebih lanjut menyebabkan bercak tersebut menjadi berlubang. Apabila bercak tersebut berbatasan dengan tepi daun maka serangan lebih lanjut mengakibatkan daun menjadi sobek. Hal tersebut sangat merugikan pendapatan petani sehingga dapat memberikan dampak yang buruk terhadap perekonomian petani dan juga mempengaruhi kualitas dari buah sehingga dapat menurunkan harga jual.

## **B. Potensi Agen Hayati**

Selama ini pengendalian penyakit ini masih bertumpu pada penggunaan fungisida. Namun disadari selain hasilnya tidak memuaskan, penggunaan pestisida terus menerus dapat mengakibatkan timbulnya resistensi patogen, merusak lingkungan dan berbahaya bagi konsumen. Penggunaan pestisida kimiawi yang berlebihan memberi dampak negatif terhadap lingkungan dan manusia. Keseimbangan alam terganggu dan akan mengakibatkan timbulnya hama yang resisten, ancaman bagi predator, parasit, ikan, burung dan satwa lain. Salah satu penyebab terjadinya dampak negatif pestisida terhadap lingkungan adalah adanya residu pestisida di dalam tanah sehingga dapat meracuni organisme non target, terbawa sampai ke sumber-sumber air dan meracuni lingkungan sekitar. Bahkan, residu pestisida pada tanaman dapat terbawa sampai pada mata rantai makanan, sehingga dapat meracuni konsumen, baik hewan maupun manusia (Junaedy, 2009).

Dalam hal penanggulangan untuk mengurangi terjadinya hal-hal negatif yang ditimbulkan oleh pestisida sintetik maka dilakukan pengembangan pestisida hayati yang diindikasikan lebih ramah lingkungan dan aman bagi kesehatan. Pestisida hayati merupakan formulasi yang mengandung mikroba tertentu baik berupa jamur, bakteri, maupun virus yang bersifat antagonis terhadap mikroba lainnya (penyebab penyakit tanaman) atau menghasilkan senyawa tertentu yang

bersifat racun baik bagi serangga (hama) maupun nematoda (penyebab penyakit tanaman). Formulasi *Beuveria bassiana* (isolat Segunung) mampu mengendalikan hama kumbang moncong yang merupakan hama utama anggrek dan serta mengendalikan kumbang mawar serta kutu daun pada tanaman krisan. Dari kelompok bakteri yang telah banyak diteliti dan digunakan sebagai agen hayati (pestisida hayati) adalah genus *Bacillus* (*B.polimyxa*, *B.subtilis* dan *B.thuringiensis*), *Pseudomonas* (*P.Fluorescens*-Pf), kelompok cendawan (*Trichoderma harzianum* dan *Gliocladium* sp) (Junaedy, 2009).

Bakteri antagonis dianggap sebagai agen pengendalian biologis yang ideal karena pertumbuhannya yang cepat, penanganannya mudah dan kolonisasi agresif pada rizosfer akar tanaman. Bakteri ini dapat memediasi aktivitas biokontrol oleh satu atau lebih jenis penekanan mekanisme penyakit (Weller, 1988). Namun, mekanisme utama patogen inhibisi adalah dengan menghasilkan metabolit sekunder. Demikian bakteri sebagian besar terlibat dalam pengendalian biologis bakteri patogen tanaman dan jamur. Bakteri antagonis menghasilkan senyawa antimikroba yang penting untuk pertahanan diri terhadap organisme lain misalnya, *Bacillus* sp. Produksi senyawa antimikroba telah digunakan sebagai agen biokontrol terhadap jamur patogen tanaman (Yilmaz *et al.*, 2005). Demikian pula, *Burkholderia cepacia* kompleks yang sebelumnya dikenal sebagai *Pseudomonas cepacia* adalah kelompok dari sembilan spesies bakteri yang berkaitan erat yang memiliki sifat yang berguna dalam lingkungan alam (Chiarini *et al.*, 2006) telah muncul sebagai agen biokontrol yang kuat untuk patogen tanaman (Bevivino *et al.*, 1998). Namun, produksi zat antimikroba tergantung pada media substrat untuk pertumbuhan optimal, suhu, pH dan konsentrasi nutrisi dalam medium (Leifert *et al.*, 1995). Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk mengeksplorasi organisme yang menguntungkan, seperti *P. fluorescens*, yang merupakan salah satu contoh yang digunakan untuk mengontrol layu *Fusarium* dari tomat. Demikian pula, *P.fluorescens* yang ditemukan menjadi efektif sebagai agen biokontrol terhadap penyakit *Phytophthora* pada lada hitam (Diby *et al.*, 2005).

### C. Bakteri Antagonis dan Mekanismenya

Bakteri yang dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati mempunyai jenis yang sangat bervariasi, tetapi bersifat sangat strain spesifik. Walaupun bakteri dari spesies yang sama potensi untuk dijadikan agen pengendali hayati

dapat sangat berbeda atau bahkan dapat bersifat kebalikan. Suatu strain dari suatu spesies dapat dijadikan sebagai agen pengendali hayati tetapi strain yang lain dalam spesies tersebut mungkin tidak mempunyai kemampuan sama sekali sebagai pengendali hayati terhadap patogen yang sama. Selain itu suatu strain dari suatu spesies mungkin dapat bersifat patogen, tetapi strain lain dari spesies tersebut dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati. Sebagai contohnya *V. alginolyticus*. Strain *Vibrio* tersebut dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati dalam budidaya salmon (*S. salar*), udang windu (*P. monodon*) dan udang vannamei (*L. vannamei*), walaupun strain lain dari *V. alginolyticus* juga diketahui sebagai patogen.

Mikroorganisme bersifat antagonis terhadap mikroorganisme lain karena menghasilkan antibiotik, bakteriosin, siderofor, lisozim, protease,  $H_2O_2$  atau asam organik sehingga pH pada media tumbuh tersebut berubah (Sugita *et al.*, 1997). Suatu bakteri antagonis dapat menghasilkan senyawa tunggal atau beberapa senyawa tersebut. Selanjutnya Verschuere *et al.* (2000) mengemukakan bahwa mekanisme bakteri antagonis yang dapat digunakan sebagai biokontrol adalah menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan patogen, terjadi kompetisi pemanfaatan senyawa tertentu atau kompetisi pemanfaatan energi, kompetisi tempat menempel, mempertinggi tanggap kebal inang, meningkatkan kualitas air dan adanya interaksi dengan fitoplankton atau zooplankton.

Sebagai contohnya *Vibrio* sp. NM 10 yang diisolasi dari *Leiognathus nuchalis* bersifat antagonis terhadap *Pasteurella piscicida* karena menghasilkan protein dengan berat molekul kurang dari 5 kDa. Protein tersebut diduga bacteriocin atau senyawa serupa bacteriocin (*bacteriocin-like substance*) (Sugita *et al.*, 1997). Senyawa yang serupa juga ditemukan oleh Gibson *et al.* (1998) dari *Aeromonas media*. Bacteriocin merupakan senyawa yang banyak dihasilkan oleh bakteri asam laktat (*lactic acid bacteria*) (Ringo dan Gatesoupe, 1998). Isnansetyo *et al.* (2001) menemukan *Pseudomonas* sp. AMSN mampu menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus* karena menghasilkan senyawa 2,4 diacetylploroglucinol.

#### **D. Studi Proteomik dan Analisis Profil Protein**

Studi proteomik merupakan kajian secara molekular terhadap keseluruhan protein yang dihasilkan dari ekspresi gen di dalam sel, terutama mengenai struktur dan fungsinya. Keseluruhan protein di dalam sel diistilahkan sebagai *proteom*.

Beberapa jenis metode telah dikembangkan untuk mempelajari protein. Proteomika menggunakan analisis 2D berupa gel elektroforesis poliakrilamida. Dengan menggunakan teknik ini, protein dalam suatu sampel dapat dipisahkan, diidentifikasi, dan diukur berdasarkan berat molekulnya. Dengan menggunakan analisis ini, berbagai jenis protein yang dihasilkan oleh beragam bakteri, seperti *Escherichia coli*, telah berhasil dipisahkan dan dipurifikasi. Teknologi lain yang dikembangkan adalah spektrometri massa yang bersifat sangat sensitif. Di samping itu, Kromatografi cair berperforma tinggi (HPLC) juga dapat digunakan dimana sampel yang digunakan diinjeksikan ke dalam kolom bertekanan tinggi dan protein yang terkandung di dalamnya akan berikatan dengan matriks yang ada.

Analisis Proteome adalah pengukuran langsung dari protein dalam hal kehadiran dan kelimpahan relative protein tersebut (Wilkins *et al.* 1996). Tujuan keseluruhan dari studi proteomik adalah karakterisasi jaringan yang kompleks dari regulasi sel. Baik kode DNA genom dari suatu organisme maupun jumlah mRNA yang dinyatakan untuk setiap produk gen (protein) yang menghasilkan sebuah keadaan gambaran akurat dari sel hidup (Lubec *et al.* 1999), yang dapat diubah oleh berbagai kondisi. Analisis proteome diperlukan untuk menentukan protein yang memiliki ekspresi yang kondisional, seberapa kuat, dan apakah ada pengaruh modifikasi posttranslational. Dua atau lebih tempat yang berbeda dari sel atau organisme (misalnya, sehat dan jaringan yang sakit) dapat dibandingkan dan upaya dilakukan untuk mengidentifikasi kualitatif dan kuantitatif spesifik dari perubahan protein.

Salah satu tantangan terbesar dari analisis proteome adalah reproduksi fraksionasi dari campuran protein kompleks sementara tetap mempertahankan hubungan kualitatif dan kuantitatif. Saat ini, dua dimensi elektroforesis gel poliakrilamid (2-D PAGE) adalah satu-satunya metode yang dapat menangani pekerjaan ini (Cutler *et al.* (1999), Fegatella *et al.* Tahun (1999), Gorg *et al.*(2000)), dan karenanya telah memperoleh kepentingan khusus. Sejak 2-D PAGE mampu menyelesaikan lebih dari 1.800 protein dalam gel tunggal (Choe dan Lee, 2000), itu penting sebagai alat utama penelitian proteomikdi mana beberapa protein harus dipisahkan untuk analisis paralel. Hal ini memungkinkan ratusan hingga ribuan produk gen untuk dianalisis secara bersamaan. Dalam kombinasi dengan computerassisted sistem evaluasi gambar untuk komprehensif

Pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif proteome, Teknik elektroforesis ini memungkinkan katalogisasi dan perbandingan data di antara kelompok peneliti.

## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan mulai dari bulan Oktober 2014 – April 2015 di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Jadwal kegiatan penelitian dapat dilihat di Lampiran 1.

### B. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain cawan petri ukuran 9 cm, bunsen, LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*), labu erlenmeyer, *beaker glass*, botol Schott, tabung eppendorf (2 mL, 1,5 mL, dan 200 ul), tip mikropipet (biru, kuning, putih), tusuk gigi, tabung *falcon* (15 mL dan 50 mL), *shaking incubator*, autoklaf, *cooling centrifugator*, *SDS-PAGE package system*, jarum ose, kamera, kain penyaring, timbangan analitik, pH meter, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain jamur *Colletotrichum gloeosporioides* (koleksi laboratorium bioteknologi dan pemuliaan tanaman FP-UA), isolat bakteri UBCR-036, isolat bakteri UBCF-013, media NA (*Nutrient Agar*), media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dasar, media LB (*Luria Bertani*), aceton dingin, buffer A dan B, akuades, alkohol 70%, 10% APS, TEMED, 30% *acrylamide stock*, 1x *SDS loading buffer*, isopropanol, *protein running buffer*, *commassie blue staining solution*, dan *prestained protein marker*.

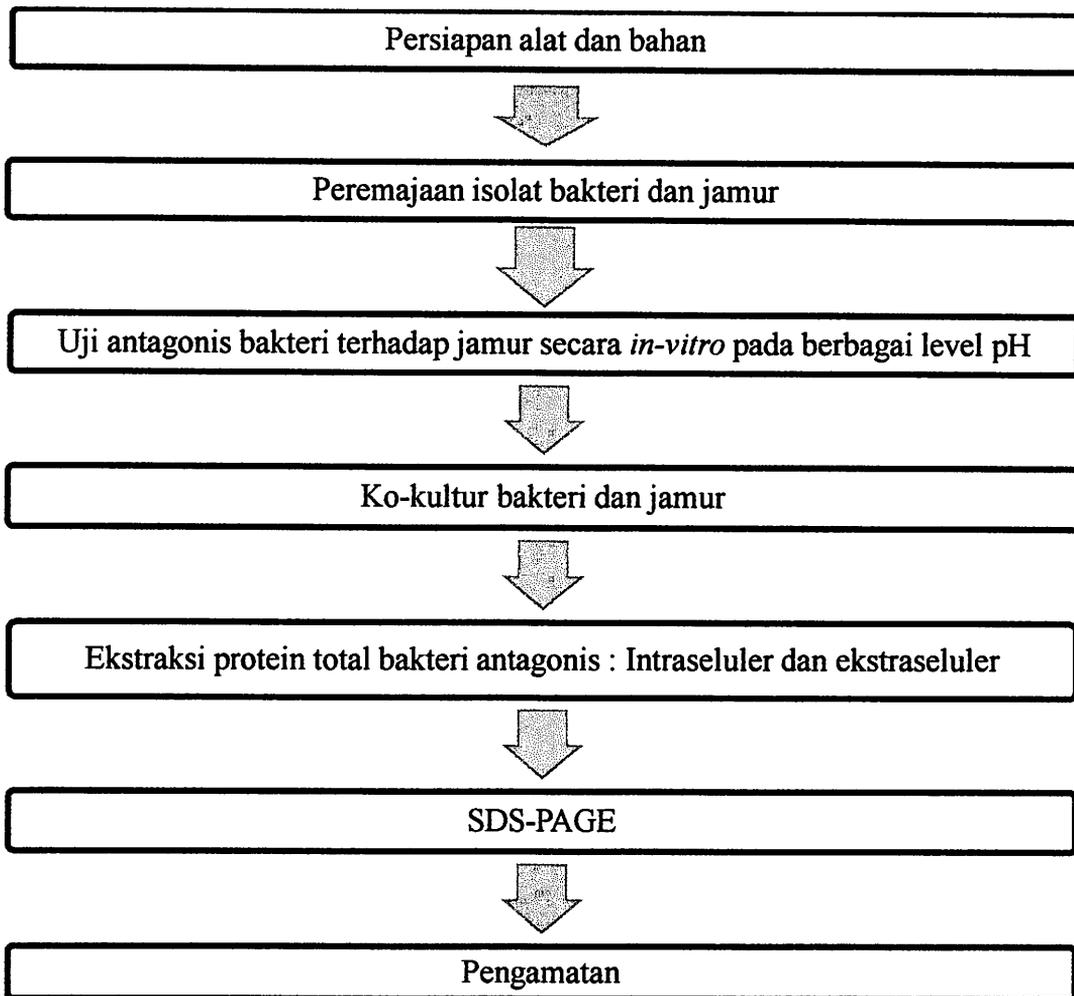
### C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dan deskriptif. Metode eksperimen dilakukan dengan uji antagonis pada media padat dan cair serta SDS PAGE dengan perlakuan pH. pH yang digunakan adalah 5,6,7,8, dan 9. Metode deskriptif dilakukan dengan menjelaskan hasil yang diperoleh dari eksperimen yang dilakukan.

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Colletotrichum gloeosporioides* dan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua isolat, yakni UBCR-036 (bakteri rizosfer) dan UBCF-013 (bakteri filoplan) yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman FP-UA.

#### D. Prosedur Pelaksanaan

Prosedur pelaksanaan yang dilakukan dalam penelitian ini secara sistematis dapat dilihat pada Gambar 1 sebagai berikut.



Gambar 1. Bagan alir kegiatan penelitian

##### 1. Persiapan alat dan bahan

Kegiatan ini meliputi sterilisasi alat seperti cawan petri, botol Schott, labu erlenmeyer, tabung falcon, *beaker glass*, tip mikropipet, tabung eppendorf, dan tusuk gigi, serta sterilisasi media (tahapan pembuatan media disajikan di Lampiran 1) dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C selama 60 menit.

## 2. Peremajaan isolat jamur dan bakteri

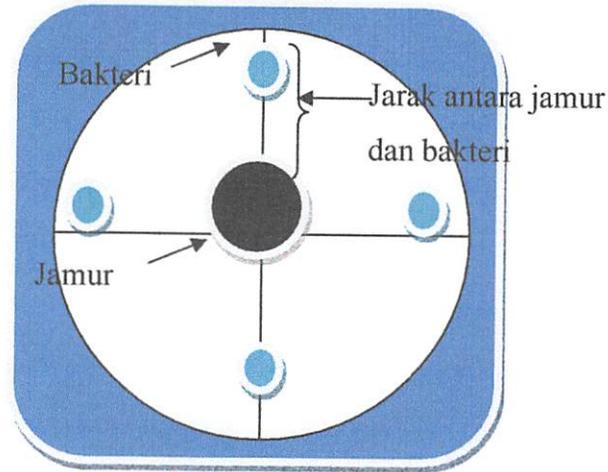
Perbanyakan isolat jamur dilakukan pada media PDA. Miselia jamur dari media sebelumnya diambil seukuran 50 x 50 mm dengan menggunakan jarum ose. Selanjutnya potongan miselia tersebut ditempatkan di atas media PDA yang baru dan diinkubasi selama 7 hari di suhu ruang.

Perbanyakan isolat bakteri dilakukan pada media NA dengan cara menggoreskan bakteri menggunakan jarum ose di atas permukaan media. Selanjutnya bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 1-2 hari.

## 3. Uji Antagonis Bakteri Terhadap Jamur Secara *In-Vitro* Pada Berbagai Level pH

### a. Uji Antagonis Media Padat

Pengujian karakteristik antagonis bakteri terhadap jamur dilakukan untuk menganalisis daya hambat bakteri antagonis dalam menekan pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*. Pada penelitian ini, kemampuan antagonis dari bakteri diuji di berbagai tingkatan pH, mulai dari pH 5,6,7,8, dan 9. Potongan jamur berukuran 50 x 50 mm ditumbuhkan pada media PDA dengan modifikasi pH dan diinkubasi selama 48 jam di suhu ruang. Kemudian kedua isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) ditumbuhkan di media LB cair dan di-*shaker* dengan kecepatan 68 rpm pada suhu ruang selama 18 jam (*overnight*). Selanjutnya kerapatan (*optical density*) dari kultur bakteri diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm untuk memperoleh nilai  $OD_{600nm}=1,0$ . Sebanyak 5  $\mu$ l kultur cair bakteri ditempatkan di empat titik berbeda yang berjarak 3 cm dari pusat tumbuh jamur di media PDA dengan modifikasi pH dan diinkubasi selama 8 hari di suhu 30°C (Gambar 2). Sebagai kontrol, jamur yang ditumbuhkan di masing-masing level pH tidak diberi aplikasi kultur cair bakteri. Dalam pengujian ini, sampel dari masing-masing perlakuan pH dibuat dalam lima ulangan.



Gambar 2. Skema uji antagonis bakteri terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in-vitro*

### b. Ko-Kultur Bakteri Dan Jamur

Pada tahap ko-kultur ini, jamur dan bakteri antagonis ditumbuhkan di media yang sama di dalam botol kultur yang sama juga. Hal ini bertujuan untuk mendorong terjadinya interaksi atau kontak langsung antara bakteri antagonis dan jamur. Pertama jamur ditumbuhkan di media LB cair dan di-*shaker* pada kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 4 hari. Kemudian, pellet miselia yang tumbuh disaring menggunakan kain kasa steril lalu dicuci sebanyak tiga kali dengan aquades.

Sementara itu, bakteri juga dikulturkan di media LB cair selama 18 jam (*overnight*) dan di-*shaker* dengan kecepatan 60 rpm pada suhu ruang. Setelah dikulturkan, kerapatan (*optical density*) dari kultur bakteri diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm untuk memperoleh nilai  $OD_{600nm}=1,0$ . Selanjutnya, kultur bakteri diendapkan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama dua menit untuk mendapatkan pelletnya. Pellet bakteri lalu dicuci sebanyak 3 kali dengan aquades steril.

Pellet bakteri dan pellet miselia yang telah dicuci kemudian digabungkan di dalam satu botol kultur yang telah berisi 50 mL media LB cair dengan modifikasi pH. Sampel ko-kultur ini selanjutnya diinkubasi di suhu 30°C dengan kecepatan 160 rpm selama 24 jam. Sebagai kontrol, pellet bakteri dan pellet miselia ditumbuhkan secara terpisah di media yang sama dengan media pada sampel ko-kultur dan pada kondisi tumbuh yang sama pula.

#### 4. Ekstraksi Protein Ekstraseluler Dan Intraseluler

Tahap ekstraksi protein dilakukan untuk memisahkan protein-protein yang diekspresikan oleh sel pada kondisi lingkungan tertentu. Pada penelitian ini, metode yang digunakan untuk ekstraksi protein total bakteri didasarkan pada protokol dari Zhang *et al* (2009) dengan beberapa modifikasi. Pertama, miselia jamur pada sampel ko-kultur dipisahkan terlebih dahulu menggunakan kain kassa steril. Kemudian kultur bakteri yang telah bebas miselia diresuspensi pada kecepatan 4.000rpm dengan suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung baru dan digunakan sebagai bahan untuk ekstraksi protein ekstraseluler. Sementara itu, pellet yang didapatkan akan menjadi bahan untuk ekstraksi protein intraseluler.

##### a. Ekstraksi Protein Intraseluler

Pellet yang diperoleh dari sampel ko-kultur dicuci menggunakan 5 ml buffer potassium fosfat pH 7,4 dan diendapkan dengan sentrifugasi berkecepatan 4.000rpm pada suhu 4°C selama 20 menit dan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian ditambahkan 3 mL buffer lisis(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM sukrosa, 10 mM PMSF, 1 mM DTT, 1% Triton X-100)dingin ke dalam sampel dan dilisis menggunakan metode *freeze-thawing* dengan tiga kali pergantian suhu inkubasi dari 95°C ke -80°C dan interval 5 menit.Sampel diresuspensi dengan kecepatan 4.000rpm selama 15 menit, lalu supernatant dipindahkan ke tabung baru dan dilarutkan dengan 2 ml buffer fenol. Setelah itu, sampel diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit dan diambil fasa fenolnya. Sebanyak 5 ml 100mM ammonium asetat-methanol ditambahkan ke dalam fasa fenol dan diinkubasi selama semalam. Sampel diresuspensi pada kecepatan 4.000rpm 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet dicuci dengan 5 ml acetone dingin sebanyak tiga kali pada kecepatan 4.000rpm 15 menit. Pellet kemudian dikeringkan didalam es hingga sisa acetonnya menguap lalu ditambahkan 2 ml buffer sampel(8 M urea, 2% CHAPS, 0.001 bromophenol blue, 0.2% ampholyte, 50 mM DTT)dan disimpan pada suhu -80°C.

##### b. Ekstraksi Protein Ekstraseluler

Supernatan yang diperoleh dari sampel ko-kultur diendapkan pada kecepatan 4.000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit dan supernatan dipindahkan

ke tabung baru. Setelah itu, supernatan dipresipitasi dengan 20% TCA-aceton sebanyak setengah kali volume supernatan dan diinkubasi pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama semalam. Sampel selanjutnya diendapkan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit. Pellet lalu dicuci tiga kali dengan aceton dingin sebanyak 5 ml dan dikering anginkan. Lalu sampel diresuspensi dengan 2 ml buffer sampel dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5. SDS-PAGE

*Sodium Duodecyl Sulfonate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) bertujuan untuk memvisualisasikan hasil ekstraksi protein yang telah diperoleh. Pertama dilakukan perakitan *gel cassette* SDS PAGE pada *stander-nya* dengan menggabungkan sepasang *glass slide*. Lalu *glass slide* yang sudah terpasang diisi dengan aquades untuk memastikan *gel cassette-nya* tidak mengalami kebocoran. Setelah itu, *gel* SDS PAGE dengan konsentrasi 15% dibuat dengan komposisi sesuai urutan pada tabel 2. *Separating gel* dibuat terlebih dahulu lalu dituang ke dalam *gel cassette* hingga batas tertentu. Setelah *separating gel-nya* membeku, *stacking gel-nya* dibuat dan dituang diatas *separating gel* hingga memenuhi *gel cassette*. Kemudian *comb* ditempatkan secara hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara.

Tabel 1. Komposisi gel SDS PAGE untuk dua gel

	<i>Separating Gel (15%)</i>	<i>Stacking Gel</i>
Buffer A	5 mL	-
Buffer B	-	2.5 mL
30% Acrylamid	5 mL	1 mL
Water	-	1.45 mL
10% APS	250 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
Temed	5 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$

Sebanyak 25  $\mu\text{l}$  sampel protein disiapkan dan ditambahkan dengan 5x SDS *loading buffer* (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.5% BPB, 50% gliserol, 100 mM DTT) (yang telah ditambahkan 100 mM DTT) sebanyak 5  $\mu\text{l}$ . Lalu sampel dipanaskan pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam gel dan disertakan dengan 10  $\mu\text{l}$  *prestained protein ladder*.

Gel di-*running* dengan arus 200 volt dan 200 mA selama 40 menit. Setelah selesai, gel dilepaskan dari *cassette*-nya dengan hati-hati dan *stacking gel*-nya dibuang. Selanjutnya *separating gel* direndam dalam akuades dan dipanaskan di *microwave* pada kondisi *medium high* selama 1 menit. Selanjutnya aquades gel dicuci lagi dengan aquades sebanyak dua kali selama 10 menit di suhu ruang pada *shaker* berkecepatan 70 rpm. Lalu gel direndam dengan *commassie staining blue* selama semalam diatas *shaker* berkecepatan 70 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya *commassie staining blue* dibuang dan gel dicuci dengan aquades sebanyak tiga kali selama 10 menit di suhu ruang dan diatas *shaker* dengan kecepatan 70 rpm sebelum gel didokumentasikan menggunakan *scanner*.

## E. Pengamatan

### a. Daya Hambat Bakteri Terhadap Jamur

Pengukuran daya hambat bertujuan untuk mengetahui besar kecilnya aktivitas antagonis kedua isolat bakteri terhadap jamur *C. gloeosporioides*. Pengamatan ini dilakukan selama 8 hari setelah aplikasi kultur cair bakteri di media tumbuh jamur. Daya hambat bakteri ini dihitung berdasarkan rumus yang dikemukakan oleh Islam *et al.* (2012) :

$$\text{persentase (\%)} \text{ zona hambat} = \frac{DK - DP}{DK} \times 100\%$$

Dimana : DK = Diameter kontrol

DP = Diameter perlakuan

### b. Pengukuran Konsentrasi Protein

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan untuk mengukur jumlah protein yang berhasil diekstraksi dari sampel. Kegiatan ini dilakukan setelah proses ekstraksi protein dengan bantuan Quick Start™ Protein Assay Kit (Biorad). Sebelum menghitung konsentrasi protein hasil ekstraksi, terlebih dahulu dibuat kurva standar protein menggunakan 2 mg/ml *bovine serum albumin* (BSA). Tujuan pembuatan kurva standar ini adalah sebagai acuan dalam menentukan konsentrasi protein sampel. Kurva standar BSA dibuat dengan komposisi tertentu seperti yang tersaji di Tabel 2. Dari masing-masing kuvet, diambil 20 µL dan ditambahkan dengan 1 mL 1x *Bradford dye reagent*. Selanjutnya campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian masing-masing campuran

tersebut dibuat dalam dua ulangan dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai regresi dari kurva standar tersebut.

Setelah kurva standar selesai diukur, sampel hasil ekstraksi disiapkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  lalu dilarutkan dengan 1 mL *Bradford dye reagent* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian masing-masing campuran tersebut dibuat dalam dua ulangan dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Setelah diperoleh nilai absorbansinya, konsentrasi protein sampel dapat ditentukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel dan nilai regresi kurva standar BSA menggunakan rumus berikut :

$$\text{Konsentrasi protein } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{\text{Nilai Absorbansi Protein Sampel}}{\text{Nilai Regresi Kurva Standar BSA}}$$

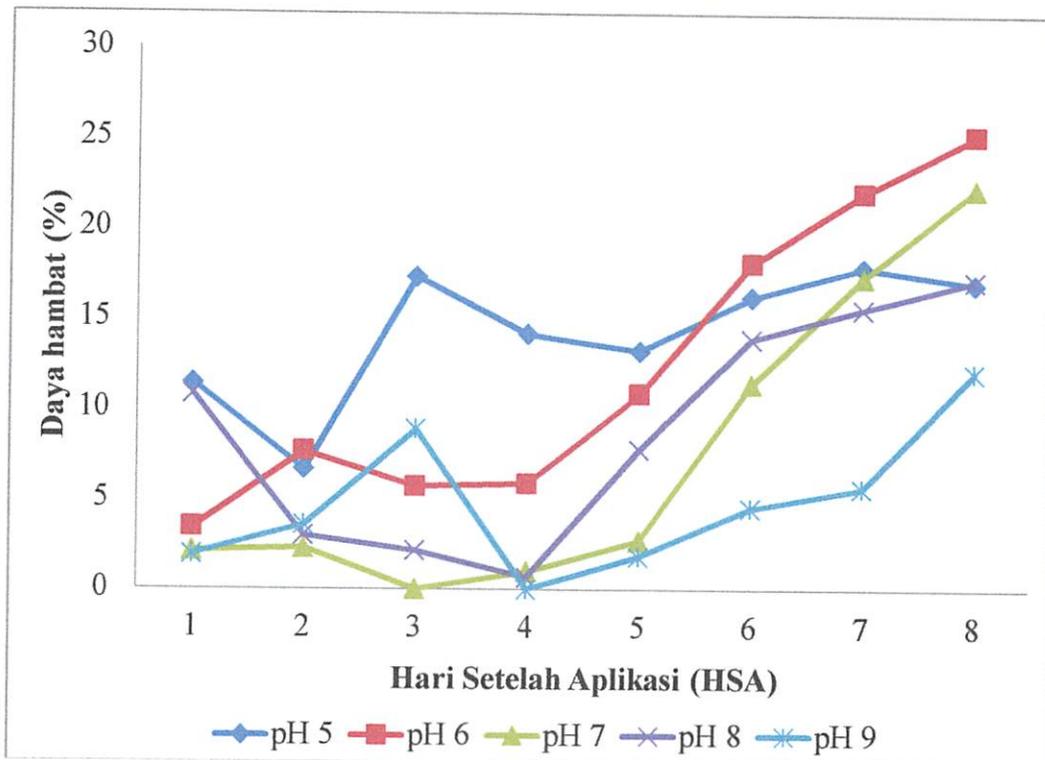
Tabel 2. Komposisi pembuatan kurva standar BSA

No. Kuvet	Vol. BSA ( $\mu\text{l}$ )	Sumber BSA	Vol Buffer Sampel ( $\mu\text{l}$ )	Konsentrasi Protein ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	70	Stok (2mg/mL)	-	2000
2	75	Stok (2mg/mL)	25	1500
3	70	Stok (2mg/mL)	70	1000
4	35	Kuvet 2	35	750
5	70	Kuvet 3	70	500
6	70	Kuvet 5	70	250
7	70	Kuvet 6	70	125
8	0	0	70	0

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

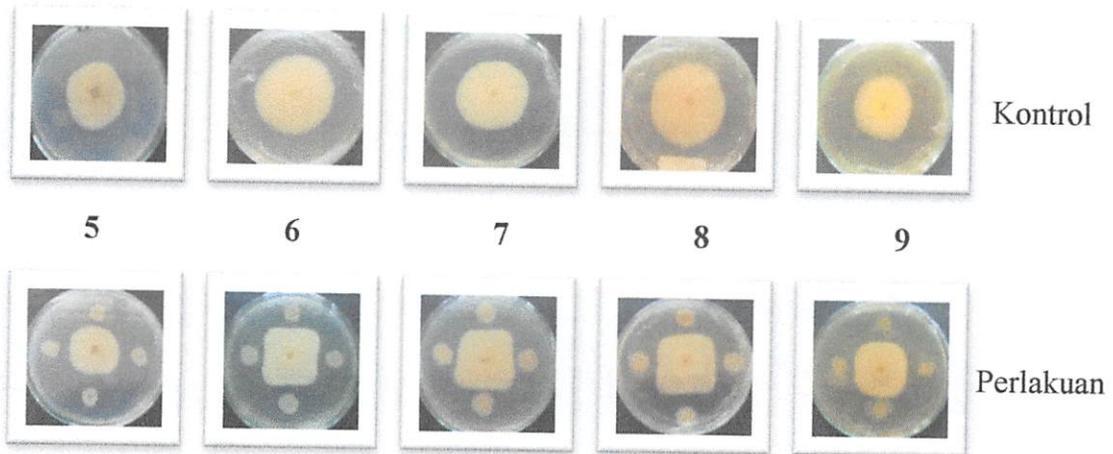
### A. Daya Hambat Bakteri Antagonis terhadap Jamur *C. gloeosporioides*.

Masing-masing isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) memperlihatkan kemampuan antagonis terhadap *C. gloeosporioides* yang bervariasi (Gambar 3, 4, 5 dan 6) pada berbagai perlakuan pH. Bakteri UBCR-036 menunjukkan daya hambat tertinggi pada pH 6 sebesar 25,2% yang diperoleh pada 8 HSA. Daya hambat terendah ditunjukkan pada pH 9 sebesar 12,05% pada 8 HSA. Pada pH 5, 7, dan 8, daya hambat bakteri ini mencapai 17,83% (7 HSA), 22,22% (8 HSA), dan 17,14% (8 HSA) (Gambar 3). Walaupun persentase daya hambat pada semua perlakuan pH mengalami peningkatan mulai dari hari kelima hingga kedelapan, namun persentasenya tidak tinggi dan juga kurang stabil jika dibandingkan dengan persentase per harinya.



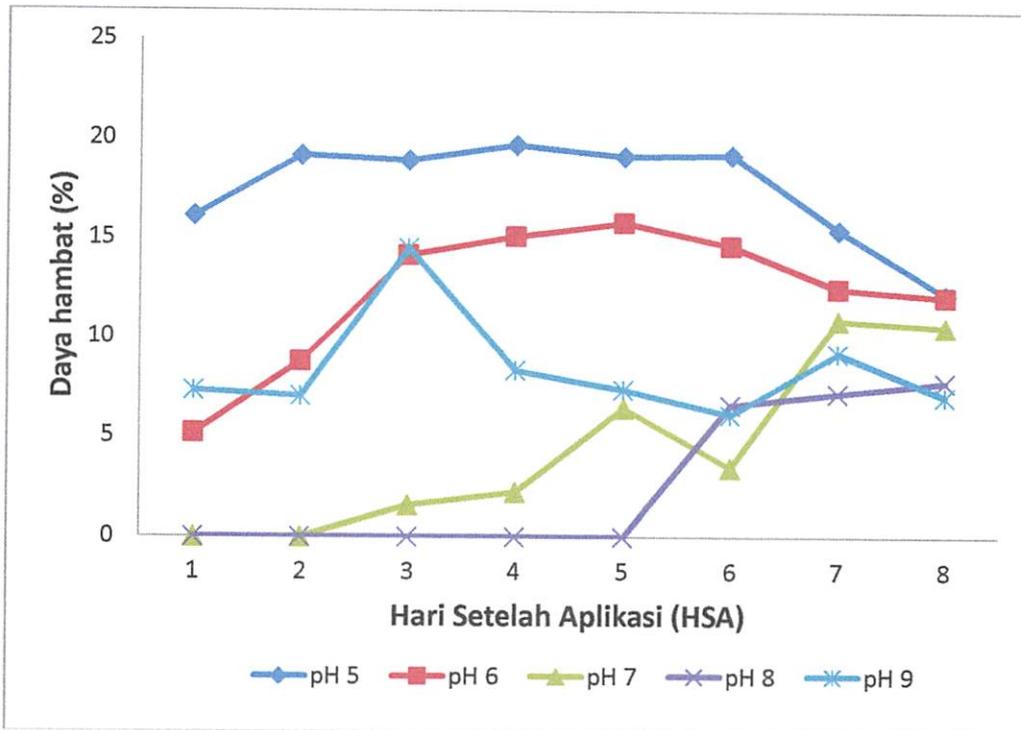
Gambar 3. Daya hambat isolat bakteri UBCR-036 terhadap jamur *C. gloeosporioides* pada berbagai level pH.

Berikut adalah dokumentasi uji antagonis media padat antara isolat bakteri UBCR-036 dengan jamur *C. gloeosporioides* pada 8 HSA menggunakan metode difusi agar di media PDA. Pada gambar dibandingkan antara kontrol yaitu hanya jamur yang tumbuh pada media dan perlakuan yaitu bakteri tumbuh bersama jamur pada media :



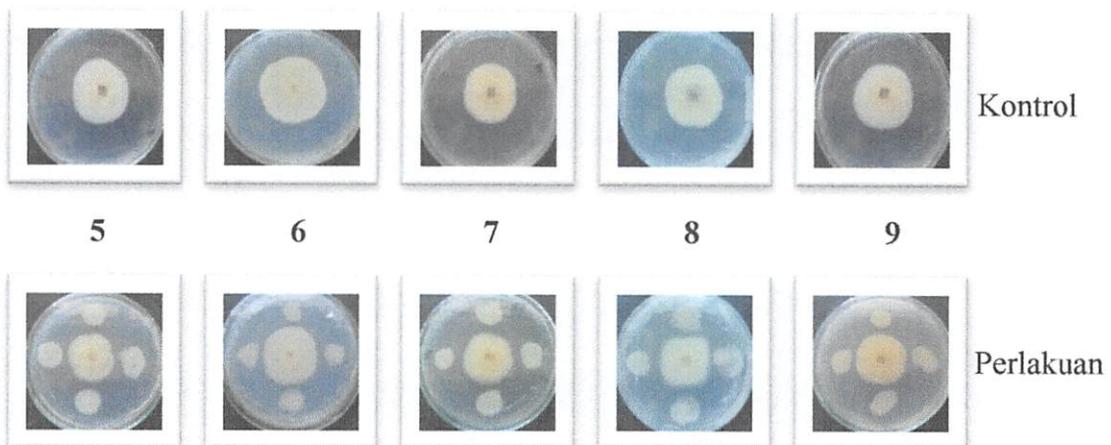
Gambar 4. Uji antagonis bakteri UBCR-036 dengan jamur *C. gloeosporioides* di media padat pada 8 HSA. 5, 6, 7, 8, 9 = pH

Sementara itu, isolat bakteri UBCF-013 memperlihatkan daya hambat tertinggi pada pH 5 sebesar 19,68% pada 4 HSA dan daya hambat terendah pada pH 8 sebesar 7,73% pada 8 HSA. Selain pH 5 dan pH 8, daya hambat bakteri UBCF-013 di pH 6, 7, dan 9 menunjukkan penekanan sebesar 15,79% (5 HSA), 10,88% (7 HSA), dan 14,58% (3 HSA) (Gambar 6). Dari grafik juga dapat dilihat bahwa pada pH 5 dan 6 persentase daya hambat per harinya cukup stabil, walaupun mengalami penurunan tapi tidak terlalu signifikan. Berbeda dengan pH 7 dan 9 yang sangat fluktuatif, sedangkan pada pH 8, persentase daya hambatnya terlihat pada 5 HSA namun pada hari 1-4 HSA persentase daya hambatnya 0% dan jika dibandingkan dengan perlakuan pH yang lain, persentase daya hambat pada pH 8 memang tergolong rendah.



Gambar 5. Daya hambat isolat bakteri UBCF-013 terhadap jamur *C. gloeosporioides* pada berbagai level pH.

Berikut adalah dokumentasi uji antagonis media padat antara isolat bakteri UBCR-036 dengan jamur *C. gloeosporioides* pada 8 HSA menggunakan metode difusi agar di media PDA. Pada gambar dibandingkan antara kontrol yaitu hanya jamur yang tumbuh pada media dan perlakuan yaitu bakteri tumbuh bersama jamur pada media :



Gambar 6. Uji antagonis bakteri UBCF-013 dengan jamur *C. gloeosporioides* di media padat pada 8 HSA. 5, 6, 7, 8, 9 = pH

Besarnya daya hambat yang dihasilkan oleh kedua isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) sangat fluktuatif pada setiap rentang pH. Hal itu disebabkan karena masing-masing bakteri menghasilkan senyawa antijamur dengan jumlah yang berbeda dari hari pertama hingga hari terakhir saat bakteri tersebut sedang tercekam dengan keberadaan jamur dan lingkungan yang ekstrim seperti pH media yang berbeda-beda. Selain itu ada faktor lain yang menyebabkan fluktuasi tersebut yaitu mekanisme umpan balik atau *feedback*. Menurut Kowalak (2011) mekanisme tersebut ada yang bersifat positif dan negatif, produksi senyawa antijamur akan meningkat jika mekanismenya bersifat positif karena rangsangan yang dihasilkan juga besar dan mekanismenya negatif jika produksi senyawa antijamur akan berkurang apabila jumlah rangsangan dari lingkungan sudah sangat berlebihan, hal itulah yang menyebabkan naik turunnya persentase daya hambat yang dihasilkan oleh kedua isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*.

Selain itu, hal yang menyebabkan terjadinya ketidakstabilan persentase daya hambat atau produksi senyawa yang dihasilkan oleh bakteri dari hari pertama hingga hari terakhir aplikasi adalah proses mekanisme antagonis dari bakteri tersebut. Menurut Harman (2003), mekanisme dari mikroorganisme antagonis terbagi 4 yaitu kompetisi, antibiosis, parasitisme, dan lisis. Kompetisi adalah usaha untuk memperoleh keuntungan substrat atau nutrisi inang (karbohidrat, nitrogen, factor tumbuh) dan tempat (tempat reseptor sel dan oksigen), antibiosis adalah penghambatan atau perusakan melalui hasil metabolit, termasuk kemampuannya mengeluarkan zat beracun toksin, parasitisme terjadi bila organisme yang satu menyerap nutrisi dari organisme lain., dan lisis adalah destruksi, desintegrasi, disolusi, atau dekomposisi sel atau jaringan inang.

Setiap jenis bakteri memiliki kemampuan daya hambat yang berbeda pada lingkungan yang berbeda. Ahlem *et al.* (2012) menyatakan bahwa 9 jenis isolat bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* mampu menekan pertumbuhan *Botrytis cinerea* pada kisaran pH 7,5-10. Sementara itu, Sugita *et al.* (1997) menyatakan bahwa sifat antagonis suatu mikroorganisme terhadap mikroorganismenya lain dapat terjadi karena adanya senyawa, seperti antibiotik, bakteriosin, siderofor, lisozim, protease, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(asam organik). Namun, kemampuan antagonis dari senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme antagonis itu bervariasi tergantung pada kondisi lingkungan yang sedang dihadapinya. Senyawa yang dihasilkan ini dapat berupa satu senyawa saja atau lebih. Pada studi yang lain, Prashar *et al.* (2013)

melaporkan bahwa kemampuan bakteri *Bacillus sp* dalam menekan pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* yang paling optimum adalah pada pH 6,5. Namun pada penelitian Nalisha *et al.* (2006), diperoleh pH yang optimum dari bakteri *Bacillus subtilis* untuk menekan pertumbuhan dari *Sclerotium rolfsii* adalah pH 11 pada 2 HSA dengan besar zona hambat 31,57%, dan diikuti oleh pH 5 dengan besar persentase zona hambat 28,33% pada 1 HSA.

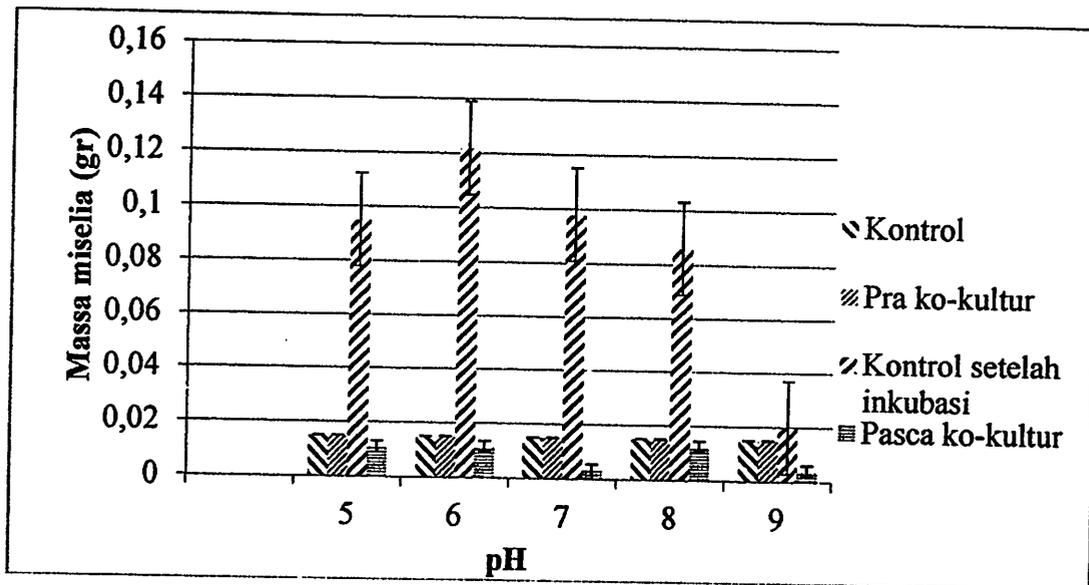
Walaupun kemampuan daya hambat dari isolat bakteri UBCR-036 lebih tinggi dibandingkan dengan UBCF-013. Namun persentase daya hambat tertinggi isolat UBCR-036 ini terjadi pada 8 HSA sementara daya hambat tertinggi dari isolat UBCF-013 muncul 4 HSA. Dari persentase daya hambat yang dihasilkan oleh isolat bakteri UBCR-036 pada pH 6 memperlihatkan kenaikan persentase dari hari pertama hingga terakhir pengamatan saat aplikasi namun untuk memperoleh persentase daya hambat yang tinggi diperlukan waktu yang cukup lama, berbeda dengan isolat bakteri UBCF-013 yang memperlihatkan persentase daya hambat tertinggi pada pH 5 di 4 HSA cukup stabil hingga pada hari terakhir pengamatan. Jika dilihat dari aspek aplikasi untuk dilapangan, yang dibutuhkan selain persentase daya hambat yang tinggi yaitu kestabilan dari daya hambat yang diberikan oleh bakteri terhadap jamur. Sedangkan untuk pH yang optimum untuk pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* adalah pada kisaran pH 5-7, namun seiring bertambahnya pH pada lingkungan tumbuh jamur tersebut, maka pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* lebih lambat (Pandey *et al.*, 2012). Namun jika ada mikroorganisme lain seperti bakteri pada media tempat jamur tersebut tumbuh maka pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* lebih lambat lagi jika dibandingkan dengan tanpa adanya mikroorganisme lain.

Pada penelitian Yani (2012), isolat bakteri UBCF-013 teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus cellulosilyticus* dari hasil analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dengan tingkat homologi 91%. Data BACMAP (*Bacterial Genome Atlas*) menyebutkan bahwa pH optimum untuk pertumbuhan bakteri *B. cellulosilyticus* adalah antara 8-10. Data yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa daya hambat tertinggi dari isolat UBCF-013 terhadap jamur *C. gloeosporioides* lebih tinggi pada pH 5 yang bukan pH optimum bagi pertumbuhan bakteri tersebut. Dari hal tersebut dapat diasumsikan bahwa bakteri *B. cellulosilyticus* dapat mengeluarkan senyawa antijamur lebih banyak saat induksi dengan pH 5 dan keberadaan jamur *C. gloeosporioides*

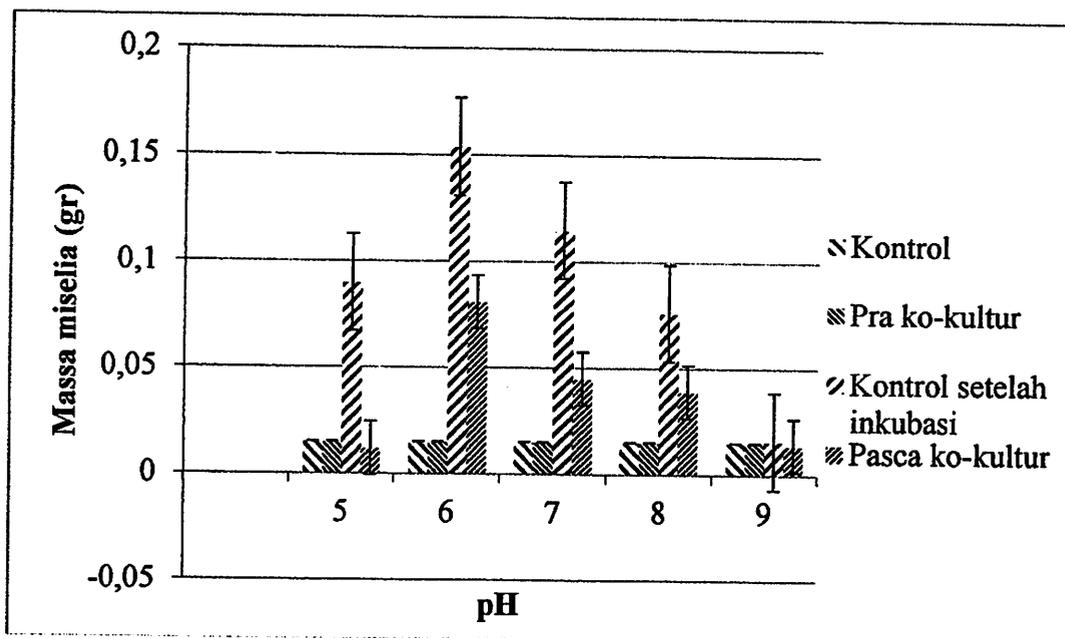
Sementara itu Riwany (2012) menyatakan bahwa Isolat bakteri UBCR-036 diidentifikasi sebagai *Bacillus* sp. Isolat bakteri UBCR-036 merupakan bakteri rizoplan yang diperoleh dari perakaran bawang. Baik bakteri rizoplan maupun filoplan, keduanya memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol bagi fitopatogen. Hanya saja, sejauh ini pengembangan bakteri filoplan masih relatif sedikit informasinya jika dibandingkan dengan bakteri rizoplan.

## **B. Uji Antagonis Media Cair atau Ko-Kultur**

Untuk memastikan bahwa terjadi proses antagonis antara jamur dan bakteri selama ko-kultur dilakukan pengukuran massa miselia jamur sebelum dan sesudah ko-kultur. Hasil tersebut sesuai dengan pendapat Pandey *et al.* (2012) dimana pH optimum untuk pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* lebih baik pada pH 5-7 dan menurun saat pH menjadi lebih basa. Massa miselia jamur yang digunakan yaitu 0.015 gram sebelum dimasukkan pada media perlakuan. Pada bakteri UBCR-036 maupun UBCF-013, massa miselia jamur setelah inkubasi selama 24 jam (Gambar 7 dan 8) pada kontrol lebih tinggi di pH 6 dan terendah pada pH 9, namun pada perlakuan ko-kultur, pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* lebih tertekan pada pH 7 jika dibandingkan dengan pH yang lainnya. pH optimum dalam menekan pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* pada media cair berbeda dengan media padat, kemungkinan hal itu disebabkan karena interaksi antara jamur dan bakteri di media cair terjadi secara langsung sedangkan di media padat tidak karena diberi jarak 3 cm antara jamur dan bakteri. Data miselia jamur dalam bentuk tabel disajikan pada lampiran 4.



Gambar 7. Diagram massa miselia jamur *C. gloeosporioides* sebelum dan sesudah ko-kultur dengan isolat bakteri UBCR-036

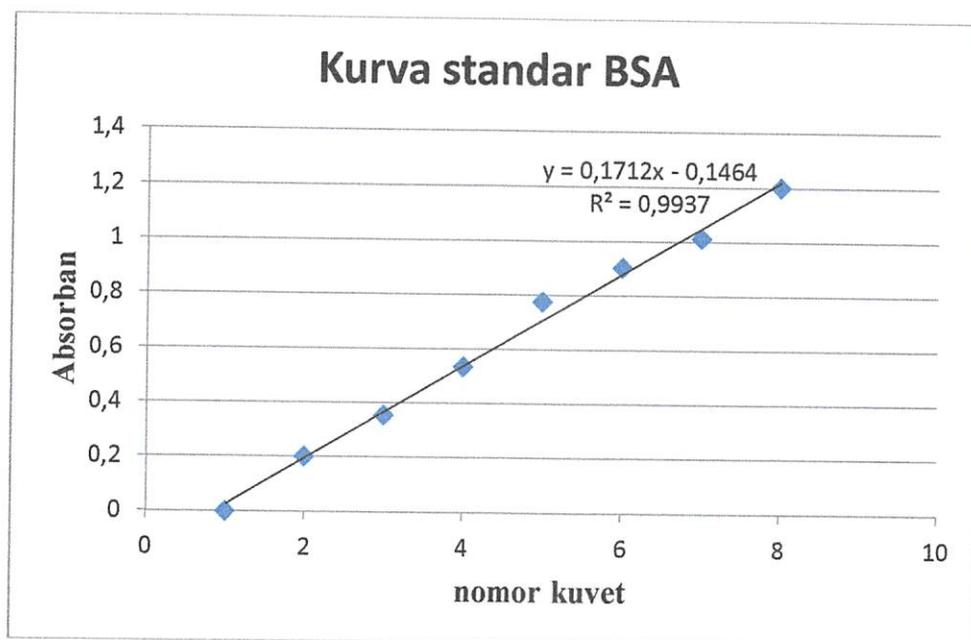


Gambar 8. Diagram massa miselia jamur *C. gloeosporioides* sebelum dan sesudah ko-kultur dengan isolat bakteri UBCF-013

Persentase daya hambat yang dihasilkan oleh kedua isolat bakteri pada uji antagonis media cair lebih tinggi pada pH 7 yaitu 96,43% untuk bakteri UBCR-036 dan 96,09% untuk bakteri UBCF-013. Hasil tersebut berbeda dengan uji antagonis di media padat. Hal tersebut disebabkan karena pada uji antagonis media cair, bakteri dan jamur berkompetisi langsung pada media sedangkan pada media padat, tempat tumbuh bakteri dan jamur diberi jarak 3 cm.

### C. Profil Protein Bakteri Antagonis pada Berbagai Level pH Selama Proses Interaksinya dengan Jamur *C. gloeosporioides*

Setelah itu dilakukan ekstraksi protein untuk memperoleh protein intraseluler dan ekstraseluler dari kedua isolat bakteri antagonis dan sebelum dilakukan pengamatan pola pita protein melalui SDS PAGE, dilakukan pengukuran konsentrasi protein sampel dengan menggunakan kurva standar BSA (Gambar 9). Pada pembuatan kurva standar akan diperoleh nilai regresi dan persamaannya dan nilai regresi yang diharapkan yaitu sama atau hampir sama dengan 1. Kemudian dari nilai persamaan yang diperoleh pada kurva standar yaitu  $y = 0,1712x - 0,1464$ , maka akan didapatkan konsentrasi protein dari setiap sampel baik protein intraseluler maupun ekstraseluler (Tabel 3 dan 4).



Gambar 9. Kurva standar BSA

Tabel 3. Kadar protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCR-036

pH	Protein Ekstraseluler				Protein Intraseluler			
	Absorban		Kadar protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		Absorban		Kadar protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
	kontrol	ko-kultur	kontrol	ko-kultur	kontrol	ko-kultur	kontrol	ko-kultur
5	1.11	1.21	7.33	7.95	0.29	0.23	2.54	2.22
6	0.90	0.82	6.12	5.67	0.18	0.16	1.93	1.79
7	1.31	1.08	8.52	7.19	0.40	0.48	3.18	3.68
8	1.31	0.90	8.52	6.12	0.25	0.24	2.31	2.23
9	1.43	1.47	9.19	9.43	0.15	0.37	1.74	3.00

Tabel 4. Kadar protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCF-013

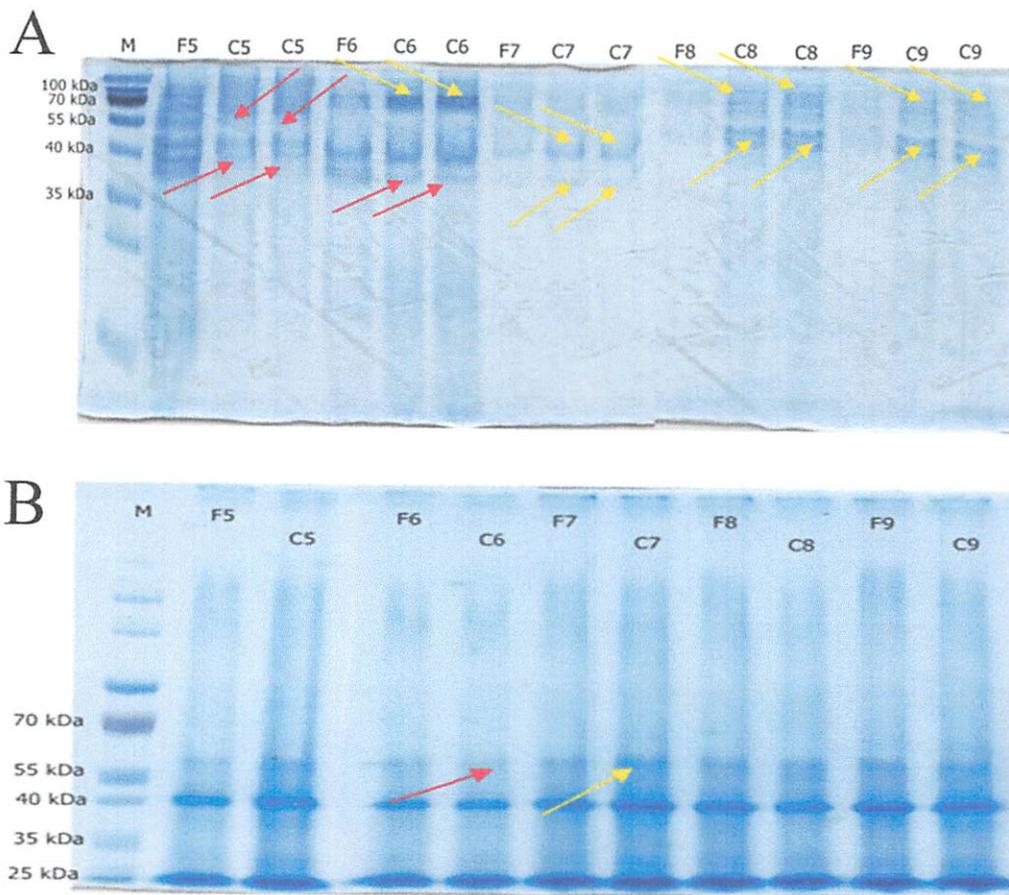
pH	Protein Ekstraseluler				Protein Intraseluler			
	Absorban		Kadar protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		Absorban		Kadar protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
	kontrol	ko-kultur	kontrol	ko-kultur	kontrol	ko-kultur	kontrol	ko-kultur
5	0.67	0.34	4.79	2.87	0.82	0.70	5.64	4.95
6	1.00	0.91	6.71	6.17	0.37	0.56	3.03	4.13
7	1.18	1.29	7.73	8.40	0.12	0.25	1.53	2.32
8	1.21	1.21	7.91	7.91	0.10	0.11	1.44	1.47
9	1.43	1.46	9.23	9.40	0.10	0.50	1.44	3.79

Untuk mengamati protein-protein yang terlibat selama proses ini dilakukan analisis profil protein. Analisis ini memanfaatkan teknik elektroforesis berupa SDS PAGE yang berguna untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya Davis *et al.* (1994). Dari hasil SDS-PAGE, masing-masing isolat bakteri antagonis (UBCR-036 dan UBCF-013) memperlihatkan profil protein yang beragam selama proses interaksinya dengan jamur *C. gloeosporioides* (gambar 5 dan 6). Profil protein yang diamati dari masing-masing isolat bakteri meliputi protein intraseluler dan protein ekstraseluler dan konsentrasi protein yang di-loading saat SDS PAGE terlebih dahulu disamakan agar setiap kontrol dapat dibandingkan dengan perlakuan ko-kultur. Untuk bakteri UBCR-036, konsentrasi protein sampel yang di-loading adalah  $12.4 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  untuk protein ekstraseluler dan  $3.0 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  untuk protein intraseluler, kemudian konsentrasi protein ekstraseluler bakteri UBCF-013 yang di-loading adalah  $6.9 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  sedangkan protein intraseluler yaitu  $2.0 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ .

Dari gambar 10, dapat dilihat pada protein intraseluler (10a), terdapat pita protein dengan ukuran 70 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 40 kDa, dan 38 kDa (lebih jelas pada tabel 5). Protein pada ukuran sekitar 70 kDa muncul pada semua kontrol maupun perlakuan ko-kultur namun ketebalannya berbeda, lalu pita protein pada ukuran sekitar 55 kDa hanya terdapat pada kontrol pH 5. Pada protein ukuran

sekitar 43 kDa muncul pada pH 5,8, dan 9 baik pada kontrol maupun perlakuan ko-kultur. Kemudian protein ukuran 40 kDa dan 38 kDa hanya muncul pada pH 5,6 dan 7 dengan intensitas ketebalan yang berbeda. Jika dikaji mengenai kontrol pada setiap level pH, maka terlihat bahwa semakin tinggi pH maka protein yang disekresikan oleh bakteri UBCF-013 semakin berkurang dan intensitasnya juga menurun seperti protein dengan ukura sekitar 70 kDa yang tersekresi pada setiap level pH namun ketebalan pita proteinnya berbeda. Banyak protein yang mengalami *up regulated* saat perlakuan ko-kultur namun ada juga yang mengalami *down regulated*. Protein *up regulated* pada perlakuan ko-kultur terdapat pada pH 6,8, dan 9 dengan ukuran protein sekitar 70 kDa, hal yang sama juga terdapat pada protein dengan ukuran sekitar 55 kDa di pH 8 dan 9, lalu protein dengan ukuran sekitar 40 kDa dan 38 kDa di pH 7, sedangkan protein yang mengalami *down regulated* terdapat pada pH 6 dengan ukuran 38 kDa dan pH 5 dengan ukuran 55 kDa, 40 kDa dan 38 kDa.

Pada protein ekstraseluler (10b), terdapat pita protein pada ukuran 58 kDa, 40 kDa, dan 25 kDa (lebih jelas pada tabel 5). dari keseluruhan perlakuan pH pada protein ekstraseluler tidak terdapat perbedaan pola pita, yang berbeda hanya intensitas protein yang disekresikan oleh bakteri UBCF-013 baik pada kontrol maupun perlakuan ko-kultur. Hal itu dapat terlihat pada protein ukuran 58 kDa yang mengalami *down regulated* di pH 6 dan *up regulated* di pH 7 pada perlakuan ko-kultur. Perbedaan pola pita protein yang dihasilkan tergantung kepada seberapa tingginya tekanan yang dihadapi oleh bakteri dan konsentrasi protein yang disekresikan. Semakin tebal pita protein maka semakin tinggi konsentrasi protein dan sebaliknya, semakin tipis pita protein maka semakin kecil konsentrasi yang dihasilkan.



Gambar 10. Visualisasi SDS PAGE protein intraseluler (a) dan ekstraseluler (b) bakteri UBCF-013 pada berbagai level pH. Konsentrasi gel yang digunakan adalah 15% ; M = *prestained protein ladder* ; F5-F9 = sampel bakteri yang tidak diko-kultur pada masing-masing pH ; C5-C9 = sampel bakteri yang diko-kultur pada masing-masing pH ; panah merah = protein *down regulated* ; panah kuning = protein *up regulated*.

Selain protein *up regulated* dan *down regulated*, juga terdapat pita protein yang tidak memiliki perbedaan pola pita baik pada kontrol maupun ko-kultur. Seperti pada pita protein intraseluler bakteri UBCF-013 ukuran sekitar 40 kDa pada pH 6, kemudian pada protein ekstraseluler dengan pita protein ukuran sekitar 58 kDa tidak terdapat perbedaan ketebalan pita protein kecuali pada pH 6, lalu pada ukuran sekitar 25 kDa di semua masing-masing perlakuan pH baik pada kontrol maupun perlakuan ko-kultur. Hasil SDS PAGE protein intraseluler maupun ekstraseluler bakteri UBCF-013, pita protein yang kemungkinan terkait dengan aktivitas antagonistik yaitu pita protein ukuran sekitar 40 dan 58 kDa.

Tabel 5. Pita protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCF-013

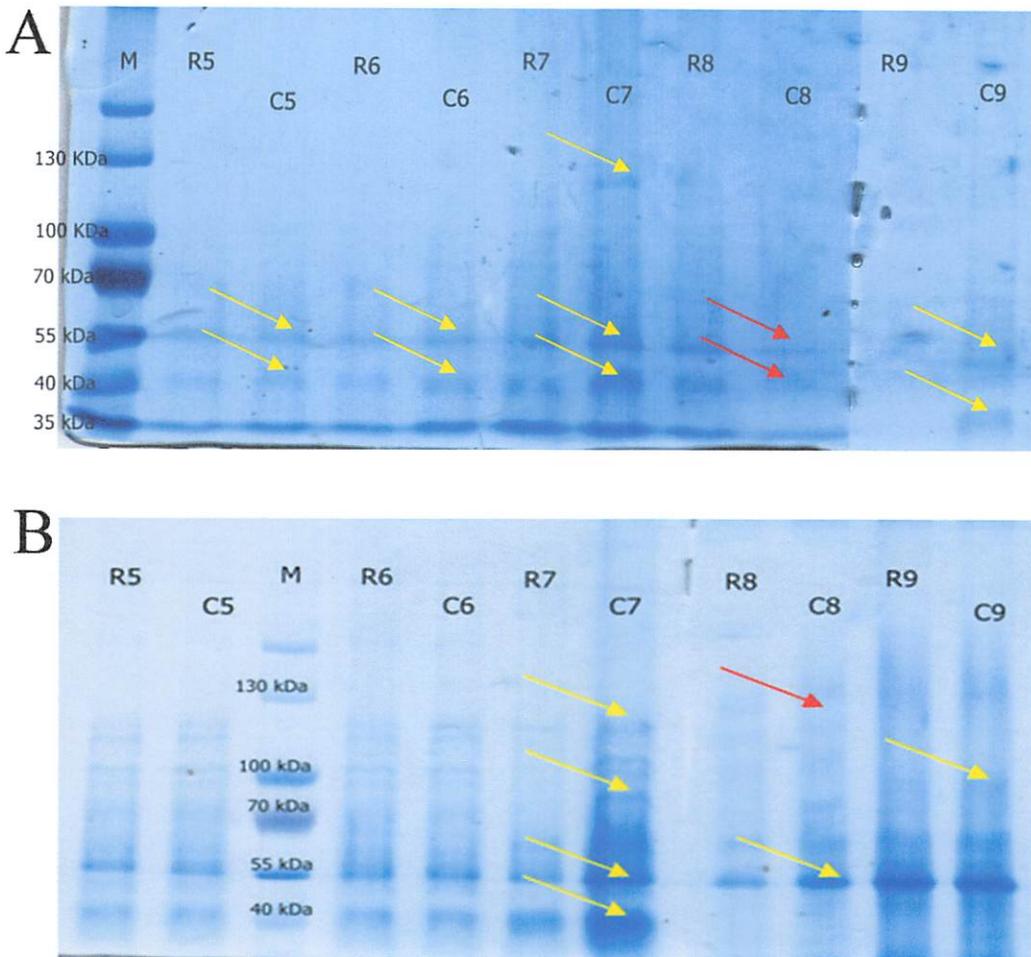
ukuran pita protein (kDa)	Intraseluler					Ekstraseluler				
	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9
70	▲	▲	-	▲	▲	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	▼	▼	▲	▼	▼
55	▼	-	-	▲	▲	-	-	-	-	-
40	▼	▼	▲	-	-	▼	▼	▼	▼	▼
38	▼	▼	▲	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	▼	▼	▼	▼	▼

Keterangan : ▲ = protein *up regulated* ; ▼ = protein *down regulated* ; ◄ = tidak terdapat perbedaan pita ; strip (-) = tidak ada pita protein; 5-9 = pH

Pada protein intraseluler bakteri UBCR-036 (Gambar 11a), terdapat protein pada ukuran 120 kDa, 55 kDa, 40 kDa, dan 35 kDa (lebih jelas pada Tabel 6). Protein pada ukuran sekitar 120 kDa cukup unik karena hanya muncul pada pH 7 saat perlakuan ko-kultur, sedangkan protein ukuran sekitar 55 kDa muncul pada setiap perlakuan kecuali pH 9 dan pada protein ukuran sekitar 35 kDa muncul pada setiap perlakuan namun intensitasnya berbeda, baik pada protein ukuran sekitar 55 kDa, 40 kDa, dan 35 kDa lebih tebal pada pH 7 dibandingkan pH yang lain baik di kontrol maupun perlakuan ko-kultur. Protein *up regulated* terdapat pada protein ukuran 55 kDa di pH 5, 6, 7, dan 9, kemudian protein ukuran 40 kDa pada perlakuan ko-kultur di pH 5,6, dan 7 saat perlakuan ko-kultur, sedangkan protein *down regulated* terdapat pada protein ukuran 55 kDa dan 40 kDa di pH 8 saat perlakuan ko-kultur. Pada protein ekstraseluler (Gambar 11b), cukup banyak protein yang disekresikan oleh bakteri UBCR-036, yaitu pada ukuran sekitar 120 kDa, 115 kDa, 105 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, dan 40 kDa (lebih jelas pada Tabel 6). Protein yang mengalami *up regulated* terdapat pada pH 7 dengan ukuran protein sekitar 115 kDa, 75 kDa, 55 kDa, dan 40 kDa saat perlakuan ko-kultur, kemudian protein ukuran sekitar 55 kDa pada pH 8, dan protein ukuran sekitar 75 kDa di pH 9 di perlakuan ko-kultur, sedangkan protein *down regulated* terdapat di pH 8 pada protein ukuran sekitar 120 kDa saat perlakuan ko-kultur.

Faktor yang dapat mendukung keberhasilan untuk mendapatkan pita protein ekstraseluler dan intraseluler saat SDS PAGE adalah faktor teknis saat proses ekstraksi protein, dimana perlunya ketelitian pada setiap tahapan yang

dilakukan agar protein dapat diperoleh dalam jumlah banyak dan dengan konsentrasi yang tinggi.



Gambar 11. Visualisasi SDS PAGE protein intraseluler (a) dan ekstraseluler (b) bakteri UBCR-036 pada berbagai level pH. Konsentrasi gel yang digunakan adalah 15% ; M = *prestained protein ladder* ; R5-R9 = sampel bakteri yang tidak diko-kultur pada masing-masing pH ; C5-C9 = sampel bakteri yang diko-kultur pada masing-masing pH ; panah merah = protein *down regulated* ; panah kuning = protein *up regulated*.

Sama halnya dengan bakteri UBCF-013, pada bakteri UBCR-036 juga terdapat pita protein yang tidak memiliki perbedaan pola pita baik pada kontrol maupun ko-kultur. Dapat dilihat pada Tabel 6, pada pita protein intraseluler bakteri UBCR-036 ukuran sekitar 35 kDa kecuali pada pH 9, kemudian pada protein ekstraseluler dengan pita protein ukuran sekitar 55 kDa tidak terdapat

perbedaan ketebalan pita protein kecuali pada pH 7 dan 8, lalu pada ukuran sekitar 40 kDa kecuali pada pH 7, 8, dan 9. Pada hasil SDS PAGE protein intraseluler maupun ekstraseluler bakteri UBCF-013, pita protein yang kemungkinan terkait dengan aktivitas antagonistik yaitu pita protein ukuran sekitar 120, 55 dan 40 kDa.

Tabel 6. Pita protein intraseluler dan ekstraseluler bakteri UBCR-036

ukuran pita protein (kDa)	Intraseluler					Ekstraseluler				
	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9
120	-	-	▲	-	-	-	-	-	▼	-
115	-	-	-	-	-	-	-	▲	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	▲	-	▲
55	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲	▲	▲
40	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲	-	-
35	▲	▲	▲	▼	-	-	-	-	-	-

Keterangan : ▲ = protein *up regulated* ; ▼ = protein *down regulated* ; ▲ = tidak terdapat perbedaan pita ; strip (-) = tidak ada pita protein; 5-9 = pH

Faktor lingkungan seperti pH dapat mempengaruhi aktivitas antijamur dari suatu mikroorganisme, karena tekanan yang dialami oleh suatu mikroorganisme dapat mendorong produksi senyawa untuk pertahanan diri. Seperti yang dilaporkan oleh Raaijmakers (2002) faktor abiotik seperti pH dapat mempengaruhi produksi dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri, Karena itu pola pita yang dihasilkan oleh bakteri saat diamati melalui SDS-PAGE juga dapat berbeda akibat perbedaan lingkungan tumbuh dari bakteri tersebut. Dalam studi yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2012) dilaporkan bahwa pH optimum bakteri *Bacillus coagulans* TQ33 terkait aktivitas antijamur berada di pH 6. Ditambahkan lagi oleh Katz and Demain (1997) sebagian besar produksi senyawa antijamur, terjadi pada fase eksponensial tergantung pada beberapa kondisi seperti strain mikroorganisme, komposisi media, dan waktu inkubasi, temperatur, dan pH.

Senyawa antijamur yang diproduksi oleh suatu mikroorganisme dapat berupa metabolit sekunder, yang produksinya dipengaruhi oleh variasi dari faktor lingkungan seperti sumber karbon dan nitrogen, kecepatan tumbuh, kondisi yang berubah-ubah (suplai oksigen, suhu, cahaya, dan pH) (Augustine *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2010 ; Rulz *et al.*, 2010). Beberapa penelitian juga telah berhasil mengidentifikasi jenis protein yang terkait dengan aktivitas senyawa antijamur. Diantaranya yaitu Wong *et al.* (2008) menemukan bahwa protein pada ukuran sekitar 50 kDa adalah Baciamin yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens*.

kemudian Tan *et al.*, (2013) melaporkan bahwa protein antijamur yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* diantaranya bacisubin (41.9 kDa), protein dari B.s G87 (50.8 kDa), protease (41.38 kDa), bacillomycin D synthetase A (448.21 kDa). Selain itu Dhinakaran *et al.*, (2012) juga memperoleh protein yang dihasilkan oleh bakteri *Corynebacterium sp.* Yaitu pada ukuran 34 kDa dan 71 kDa.

Protein intraseluler dan ekstraseluler yang disekresikan dari kedua isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) dipengaruhi oleh dua kondisi lingkungan. Hal yang pertama yaitu pH pada media yang berbeda-beda dan keberadaan jamur *C. gloeosporioides*. Untuk melihat pita protein yang kemungkinan terkait dengan aktivitas antijamur, selain pada pita protein spesifik yang hanya muncul saat perlakuan ko-kultur namun juga pada pita protein yang mengalami *up regulated* pada perlakuan ko-kultur.

## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah diperoleh dapat diambil kesimpulan, yaitu :

1. Isolat bakteri UBCR-036 memberikan daya hambat lebih tinggi terhadap jamur *C. gloeosporioides* dibandingkan isolat bakteri UBCF-013
2. Daya hambat tertinggi untuk isolat UBCR-036 dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* pada media padat adalah pada pH 6 sebesar 25.20% pada 8 HSA, sedangkan untuk isolat UBCF-013 adalah pH 5 dengan dayahambat 19.68% pada 4 HSA.
3. pH optimum dari kedua isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* pada media cair atau ko-kultur adalah pH 7 sebesar 96.43 % untuk UBCR-036 dan 96.09% untuk UBCF-013.

### B. SARAN

Diperlukan lagi optimasi lingkungan tumbuh untuk meningkatkan persentase daya hambat yang dihasilkan oleh kedua isolat bakteri (UBCR-036 dan UBCF-013) seperti suhu dan komposisi nutrisi. Selain itu, dalam proses ekstraksi protein perlu diperhatikan efektivitas masing-masing tahapan ekstraksi agar diperoleh konsentrasi protein yang lebih tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z., L. Q. Aini., A. L. Abadi. 2015. Pengaruh Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen *Sclerotium rolfsii* sacc. Penyebab Penyakit Rebah Semai Pada Tanaman Kedelai. *Jurnal HPT* 3 (1).
- Ahlem, H., E. Mohammed., A. Badoc.,and L. Ahmed. 2012. Effect of pH, Temperature and Water Activity on The Inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* Isolates. *African Journal of Biotechnology* 11(9): 2210-2217
- Anderson, N. L., N. G. Anderson. 2005. Proteome and Proteomics : New Tcehnologies, New Concepts, and New Words. *Electrophoresis*, 19: 1853-1861.
- Augustine S. K., S. P. Bhavsar, M. Baserisalehi, and B. P. Kapadnis. 2004. Isolation, Characterization and Optimization of Antifungal Activity of An Actinomycete of Soil Origin. *Indian J. Exp. Biol* (42): 928–932
- Bevivino, A., S. Sarrocco, C. Dalmastrì, S. Tabacchioni, C. Cantale and L. Chiarini.1998. Characterization of a Free-Living Maize Rhizosphere Population of *Burkholderia cepacia*: Effect of Seed Treatment on Disease Suppression and Growth Promotion of Maize. *FEMS Microbiol. Ecology*. 27: 225–237
- Bosland, P. W. and E. J. Votava. 2000. Peppers: Vegetable and Spice *Capsicums*. CABI Publishing. New York. 204 p.
- Chiarini, L., A. Bevivino., C. Dalmastrì., S. Tabacchioni and P. Visca. 2006. *Burkholderia cepacia* Complex Species: Health Hazards and Biotechnological Potential. *Trends Microbiol.*,14: 277–286
- Choe, L.H., and K.H. Lee. 2000. A Comparison of Three Commercially Available Isoelectric Focusing Units For Proteome Analysis: The Multiphor, The IPG Phor and The Protean IEF Cell, *Electrophoresis* 21: 993–1000
- Cutler, P., Bell DJ., H.C. Birrell., J.C. Connelly., S.C. Connor., E. Holmes., B.C. Mitchell., S.Y.Monte., B.A. Neville., R. Pickford., S. Polley., K. Schneider and J.M. Skehel. 1999. An Integrated Proteomic Approach to Studying Glomerular Nephrotoxicity, *Electrophoresis* 20: 3647–3658
- Dhinakaran, A., R. Rajasekaran., and S. Jayalakshmi. 2012. Antiphytopathogenic Activity of Bacterial Protein of A Marine *Corynebacterium* sp. Isolated From Mandapam, Gulf of Mannar. *Journal Biopest*, 5: 17-22

- Diby, P., M. Anandaraj., A. Kumar., and Y. R. Sarma, 2005. Antagonistic Mechanisms of *Fluorescent pseudomonads* Against *Phytophthora capsici* In Black Pepper (*Piper nigrum* Linn.). *J. Spices AromaticCrops*, 14: 94–101
- Duriat, A. S. 1990. Efikasi Fungisida Terhadap Penyakit Antraknosa Pada Buah Cabai (*Capsicum annuum* L). *Buletin Penelitian Hort.* 19(2):112 -1020
- Duriat, A.S., N. Gunaeni., dan A. W. Wulandari. 2007. Penyakit Penting Pada Tanaman Cabai dan Pengendaliannya. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Bandung. 55 h.
- Fegatella, F., M. Ostrowski., and R. Cavicchioli. 1999. An Assessment of Protein Profiles From The Marine Oligotrophic Ultra Microbacterium, *Sphingomonas* sp. Strain RB2256, *Electrophoresis* 20: 2094–2098
- Gibson, L.F., J. Woodworth, and A.M. Goerge. 1998. Probiotic Activity of *Aeromonas media* on The Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, When Challenged With *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. 169: 111-120.
- Görg A., C. Obermaier., G. Boguth., A. Harder, B. Scheibe., R. Wildgruber., and W. Weiss. 2000. The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis With Immobilized pH Gradients, *Electrophoresis*, 21: 1037–1053
- Harman, G. E. 2003. *Trichoderma* spp., Including *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. koningii* and other spp. Cornell University. Geneva. New York.
- Hidayat, I. M., I. Sulastrini., Y. Kusandriani., dan A. H. Permadi. 2004. Lesio Sebagai Komponen Tanggap Buah 20 Galur dan atau Varietas Cabai Terhadap Inokulasi *Colletotrichum capsici* dan *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Hortikultura*. 14 (3) : 161-162.
- Islam, M. R., Y. T. Jeong., Y. S. Lee., and C. H. Song. 2012. Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Bacillus subtilis* C9 Inhibiting the Growth of Plant Pathogenic Fungi. *J. Mycobiology* 40(1) : 59-66
- Isnansetyo, A., M. Horikawa and Y. Kamei. 2001. In vitro Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* of 2,4-diacetylphloroglucinol Produced by *Pseudomonas* sp. AMSN Isolated From A Marine Alga. *J. Antimicrob. Chemother.*47: 719-720.
- Jamsari. 2013. *Rekayasa Genetika*. Unri Press : Riau. Halaman 310.
- Junaedy, A. 2009. Biopestisida sebagai Pengendali Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) yang Ramah Lingkungan. *Embryo Vol. 6 No. 1*.

- Katz, E., A. L. Demain. 1997. The Peptide Antibiotics of *Bacillus*, Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions. *Bacteriological Reviews*, (41) : 449-474.
- Kim, K.D., B.J. Oh., J. Yang. 1999. Differential Interaction of a *Colletotrichum gloeosporioides* Isolat with Green and Red Pepper Fruits. *Phytoparasitica*, 27(2):1-10.
- Kowalak, J. P. 2011. Buku Ajar Patofisiologi (Professional Guide to Pathophysiology). Jakarta : EGC. Halaman 1-2.
- Leifert, C., H. Li., S. Chidburee., S. Hampson., S. Workman., D. Sigeo., H. A. S. Epton., and A. Harbour. 1995. Antibiotic Production and Biocontrol Activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal Application. Bacteriol*, 78: 97-108
- Lin, J., L. Bai, Z. Deng and J. J. Zhong. 2010. Effect of Ammonium in Medium on Ansamitocin P-3 Production by *Actinosynnema pretiosum*. *Biotechnol. Biopro. Engineer.*, 15: 119-125
- Lubec, G, Nonaka M, Krapfenbauer K, Gratzer M, Cairns N and Fountoulakis M. 1999. Expression of The Dihydropyrimidinase Related Protein 2 (DRP-2) in Downsyndrome and Alzheimer's disease brain is down regulated at the mRNA and Dysregulated at The Protein Level, *Journal Neural Transm Supplied*, 57 : 161-177
- Nalisha, I., M. Muskhazli., and T.N. Farizan. 2006. Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. *Malaysian Journal of Microbiology* (2): 19-23
- Pandey, A., L. P. Yadava., M. Manoharan., U. K. Chauhan., and B. K. Pandey. 2012 Effectiveness of Cultural Parameters On The Growth and Sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose Disease of Mango (*Mangifera indica* L.). *Online Journal of Biological Sciences*, 12 (4): 123-133.
- Pawirosoemardjo, S. 1999. Laporan Hasil Penelitian Epidemiologi dan Pengendalian Penyakit Gugur Daun *Corynespora* dan *Colletotrichum* Secara Terpadu. Pusat Penelitian Karet, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Bagian Proyek Penelitian Karet Sungai Putih, Hal 5.
- Prashar, P., N. Kapoor., and S. Sachdeva. 2013. Isolation and Characterization of *Bacillus sp* with *In-vitro* Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of Tomato. *J. Agr. Sci. Tech.* (15): 1501-1512
- Raaijmakers J. M., M. Vlami., J.T. de Souza. 2002. Antibiotic Production by Bacterial Biocontrol Agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* (81):537-47.

- Raharini, A. O., R. Kawuri, dan K. Khalimi. 2012. Penggunaan *Streptomyces* sp. Sebagai Biokontrol Penyakit Layu Pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annuum* L.) yang Disebabkan Oleh *Fusarium oxysporum* f.sp. *capsici*. *Agrotrop*, 2(2): 151-159.
- Ringo, E., and F-J. Gatesaupe. 1998. Lactic Acid Bacteria in Fish: A Review. *Aquaculture*. 160: 177-203.
- Riwany, F. 2012. Uji Antagonis Bakteri Rizosfer terhadap Pertumbuhan Jamur *Colletotrichum gloeosporioides* Secara *In Vitro* dan Analisis Sekuens Gen 16S-rRNA. [Skripsi]. Padang: Universitas Andalas.
- Ruiz, B., A. Chávez, A. Forero, Y. García-Huante, A. Romero, M. Sánchez, D. Rocha, B. Sánchez, R. Rodríguez-Sanoja, S. Sánchez and E. Langley. 2010. Production of Microbial Secondary Metabolites: Regulation by The Carbon Source. *Critical Rev. Microbiol.*, 36: 146– 167
- Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato and Y. Deguchi. 1997. *Vibrio* sp. strain NM 10 with an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida* from the intestine of Japanese coastal fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12): 4986-4989.
- Suryaningsih, E.R., Sutarya., A.S. Duriat. 1996. Penyakit Tanaman Cabai Merah dan Pengendaliannya. hal. 64-83. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Lembang.
- Syukur, M., S. Sujiprihati., J. Koswara., dan Widodo. 2007. Pewarisan Ketahanan Cabai (*Capsicum annuum* L.) Terhadap Antraknosa yang disebabkan Oleh *Collectotricum acutatum*. *Buletin Agronomi*, 35(2):112-117.
- Tan, Z., B. Lin., and R. Zhang. 2013. A Novel Antifungal Protein of *Bacillus subtilis* B25. *Springer Plus* (2): 543
- Verschuere, L., H. Heang, G. Criel, P. Sorgeloos, and W. Verstraetei. 2000. Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. From The Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *App. Environ. Microbiol.* 66(3): 1139-1146.
- Wang, H. K., R. F. Xiao, and W. Qi. 2013. Antifungal Activity of *Bacillus coagulans* TQ33, Isolated from Skimmed Milk Powder, against *Botrytis cinerea*. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 78–83
- Weller, D.V. 1988. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soil Borne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*, 97: 250–256
- Wilkins, M.R., J.C. Sanchez., A.A. Gooley., R.D. Appel., I. Humphery-Smith., D.F. Hochstrasser., and K.L. Williams. 1996. Progress with Proteome

Projects: Why All Proteins Expressed by A Genome Should Be Identified and How To Do It, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13: 19–50

- Wong, J. H., J. Hao., Z. Cao., M. Qiao., H. Xu., Y. Bai., and T. B. Ng. 2008. An Antifungal Protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*.
- Yani, R.H. 2012. Seleksi Bakteri Antagonis dari Tanaman Sawi (*Brassica juncea* L.) Sebagai Biofungisida terhadap *Colletotrichum gloesporioides* Penyebab Antraknosa pada Tanaman Cabai (*Capsicum sp*). [Skripsi]. Padang: Universitas Andalas.
- Yilmaz, M., H. Soran., and Y. Beyatli. 2005. Antimicrobial Activities of Some *Bacillus* spp. Strains Isolated From The Soil. *Microbiol. Resistance*, 161: 127–131
- Yoon, J.B. 2003. Identification of Genetic Resources, Interspecific Hybridization, and Inheritance Analysis for Breeding Pepper (*Capsicum annuum*) Resistant to Anthracnose. Disertasi. Seoul National University, Seoul.
- Zhang, C.F., Zhao F., Han F., Yang MF. 2009. Comparative Proteome Analysis *Bacillus subtilis* Strains. *Journal Microbiology Biotechnology*, 19 (4) : 351-357

### Lampiran 1. Jadwal penelitian

No	Kegiatan	Oktober				November				Desember				Januari				Februari				Maret				April							
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV				
1	Persiapan alat dan bahan	■	■																														
2	Peremajaan isolat bakteri dan jamur			■	■									■	■							■	■										
3	Uji antagonis bakteri terhadap jamur secara in-vitro pada berbagai level pH					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■																		
4	Ko-kultur bakteri dan jamur													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
5	Ekstraksi protein total bakteri antagonis : Intraseluler dan ekstraseluler															■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
6	SDS PAGE															■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
7	Pengamatan					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
8	Penulisan skripsi													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

## Lampiran 2. Pembuatan Medium

### A. Pembuatan Media

#### 1. Medium NA (*Nutrient Agar*)

Medium NA digunakan untuk peremajaan kultur bakteri. Bahan yang digunakan adalah *beef extract* sebanyak 0.75 gram, pepton 1.25 gram dan *agar for bacteriological* 3.75 gram yang dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan menambahkan akuadest 250 ml dan dimasak dengan *hotplate magnetic stirrer* hingga mendidih dan homogen. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C.

#### 2. Medium PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Medium PDA digunakan untuk peremajaan kultur jamur. Bahan yang digunakan adalah 100 gram umbi kentang yang telah dikupas dan dicuci hingga bersih lalu dipotong dadu dengan ukuran 1 cm<sup>2</sup>, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan menambahkan 250 ml aquades dan dimasak hingga mendidih. Setelah mendidih bahan disaring, ampas umbi kentang dibuang dan airnya diambil. Setelah itu, agar premium 7,5 gram dan D-glukosa 10 gram ditambahkan dan media dicukupkan dengan aquades sampai volume 500 ml. Selanjutnya, media dimasak dengan *hotplate magnetic stirrer* sampai mendidih dan homogen. Setelah itu, disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C.

#### 3. Medium LB (*Luria Bertani*)

Bahan yang digunakan adalah sebanyak 1,25 gram *yeast extract*, 2,5 gram tripeptone, 2,5 gram NaCl dan 25 µl NaOH 10 N dilarutkan dengan 250 ml aquades dalam botol media dan diaduk, kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi.

Lampiran 3. Daya hambat (%) bakteri UBCR-036 dan bakteri UBCF-013 terhadap jamur *C. gloeosporioides* pada berbagai perlakuan pH pada media padat

UBCR-036

Hari ke- Setelah aplikasi	Level pH				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
1	11.43 ± 3.91	3.42 ± 3.7	2.11 ± 4.32	10.81 ± 2.70	1.91 ± 2.61
2	6.67 ± 3.09	7.66 ± 5.12	2.27 ± 5.33	2.98 ± 3.98	3.57 ± 3.57
3	17.29 ± 1.42	5.71 ± 4.62	-0.37 ± 3.31	2.14 ± 2.65	8.89 ± 4.56
4	14.15 ± 5.80	5.85 ± 2.96	0.97 ± 2.70	0.66 ± 2.74	-1.33 ± 1.22
5	13.24 ± 4.52	10.83 ± 3.01	2.69 ± 1.95	7.78 ± 4.46	1.82 ± 4.26
6	16.2 ± 4.69	18.05 ± 2.91	11.39 ± 2.37	13.9 ± 5.69	4.52 ± 3.31
7	17.83 ± 4.12	21.98 ± 1.35	17.3 ± 3.86	15.56 ± 5.50	5.63 ± 4.11
8	16.96 ± 3.65	25.2 ± 1.04	22.22 ± 1.89	17.14 ± 5.12	12.05 ± 4.09

UBCF-013

Hari ke- Setelah aplikasi	Level pH				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
1	16.1 ± 4.08	5.14 ± 2.39	-4.62 ± 3.22	-14.17 ± 3.73	7.27 ± 4.07
2	19.14 ± 4.26	8.75 ± 4.01	-7.5 ± 1.71	-10.32 ± 3.54	7 ± 4.81
3	18.89 ± 3.04	14.14 ± 1.89	1.58 ± 2.35	-8.42 ± 4.32	14.5 ± 3.90
4	19.68 ± 1.77	15.1 ± 0.79	2.22 ± 3.51	-4.78 ± 4.96	8.3 ± 2.86
5	19.13 ± 2.38	15.79 ± 1.10	6.42 ± 2.86	-0.73 ± 3.77	7.33 ± 2.79
6	19.2 ± 2.02	14.63 ± 1.22	3.45 ± 3.23	6.56 ± 4.02	6.1 ± 1.73
7	15.44 ± 2.46	12.47 ± 1.78	10.88 ± 2.75	7.16 ± 3.24	9.17 ± 2.32
8	12.19 ± 1.93	12.09 ± 2.06	10.54 ± 3.99	7.73 ± 4.56	7.01 ± 3.51

Lampiran 4. Massa miselia jamur *C. gloeosporioides* pra ko-kultur dan pasca ko-kultur dengan isolat bakteri UBCR-036 dan bakteri UBCF-013

UBCR-036

pH	Kontrol	Kontrol setelah inkubasi	Pra ko-kultur	Pasca ko-kultur	persentase (%) daya hambat
5	0.015	0.095	0.015	0.011 ± 0.0014	88.42
6	0.015	0.122	0.015	0.0115 ± 0.0021	90.57
7	0.015	0.098	0.015	0.0035 ± 0.0021	96.43
8	0.015	0.086	0.015	0.0125 ± 0.0007	85.47
9	0.015	0.02	0.015	0.004 ± 0.0014	80.00

UBCF-013

pH	Kontrol	Kontrol setelah inkubasi	Pra ko-kultur	Pasca ko-kultur	persentase (%) daya hambat
5	0.015	0.09	0.015	0.012 ± 0.0000	86.67
6	0.015	0.154	0.015	0.081 ± 0.0014	47.40
7	0.015	0.115	0.015	0.0045 ± 0.0021	96.09
8	0.015	0.076	0.015	0.039 ± 0.0014	48.68
9	0.015	0.016	0.015	0.014 ± 0.0014	12.50