

**SELEKSI MUTAN ANTIBIOSIS *Bacillus subtilis* B315
UNTUK PENGENDALIAN *Ralstonia solanacearum* Pr7**

***Selection of Bacillus subtilis B315 Antibiosis Mutant
to Controlling Ralstonia solanacearum Pr7***

Oleh

Nur Prihatiningsih¹, Triwidodo Arwiyanto², Bambang Hadisutrisno² dan Jaka Widada²

¹Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman
Jl dr. Suparno No 61 Karangwangkal Purwokerto

²Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada
Jl. Flora Bulaksumur Yogyakarta

Alamat korespondensi: Nur Prihatiningsih (nur_pri@yahoo.com)

ABSTRAK

Bacillus subtilis B315 adalah bakteri antagonis terhadap patogen tanaman seperti *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri. Salah satu mekanisme antagonisme adalah antibiosis. Mutan antibiosis dibuat untuk membuktikan bahwa *B. subtilis* B315 mempunyai mekanisme antibiosis dalam mengendalikan *R. solanacearum*. Tujuan penelitian adalah untuk menyeleksi mutan antibiosis *B. subtilis* B315 dibandingkan dengan *B. subtilis* B315 tipe alaminya, 2) mendeteksi sifat antibiosis dari *B. subtilis* B315. Metode yang digunakan adalah eksperimen melalui mutagenesis dengan EMS, seleksi mutan berdasarkan pengujian antibiosis, waktu generasi, pola nutrisi dan konsistensi koloni. Sifat antibiosis dideteksi dengan ekstraksi metabolit sekunder. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mutagenesis dengan EMS yang optimum adalah pada waktu 274,7 menit dengan kematian maksimum 81,7%, Terdapat tiga kelompok mutan antibiosis yaitu yang tidak menghambat *R. solanacearum*, menghambat dengan zona hambatan 1-3 mm dan menghambat dengan zona hambatan >3 mm. Mutan antibiosis terpilih yang kehilangan sifat menghambat, namun waktu generasi dan pola nutrisi serta konsistensi koloni sama dengan *B. subtilis* B315 tipe alami adalah mutan M16. Sifat antibiosis *B. subtilis* B315 ditunjukkan dengan metabolit sekunder yang diekstrak dengan metanol, menghasilkan puncak spot yang berbeda dengan mutan antibiosis M16.

Kata kunci: *Bacillus subtilis* B315, mutan antibiosis, pengendalian, *Ralstonia solanacearum* Pr7

ABSTRACT

Bacillus subtilis B315 is an antagonistic bacterium against plant pathogens such as *Ralstonia solanacearum* that causes bacterial wilt disease. One of the antagonistic mechanisms is antibiosis. Antibiosis mutant is made to prove that *B. subtilis* B315 has an antibiosis mechanism in controlling *R. solanacearum*. Aims of the research were 1) to select the *B. subtilis* B315 antibiosis mutant compared with *B. subtilis* B315 wild type, and 2) to detect antibiosis characters owned by *B. subtilis* B315. The method used was an experiment through mutagenesis with EMS, mutant selection based on antibiosis test, generation time, nutrition pattern and colony consistency. Antibiosis characters were detected by extraction of secondary metabolites. Results of the research performed that optimal mutagenesis with EMS was at 274.7 minutes by maximum lethality of 81.7%. There were 3 groups of antibiosis mutants i.e. not inhibiting *R. solanacearum*, inhibition with 1-3 mm of inhibiting zone, and inhibition with >3 mm of inhibiting zone. The selected antibiosis mutant lost its inhibiting character, but the generation time and the nutrition pattern and the colony consistency similar to *B. subtilis* B315 wild type was the M16 mutant. Antibiosis characters of *B. subtilis* B315 were shown by secondary metabolites extracted with methanol to produce the peak spot that was different from the M16 antibiosis mutant.

Key words: *Bacillus subtilis* B315, antibiosis mutant, control, *Ralstonia solanacearum* Pr7

PENDAHULUAN

Bacillus sp. adalah bakteri antagonis terhadap beberapa patogen tular tanah dan tular udara. Patogen tular tanah dan patogen daun yang telah berhasil dikendalikan oleh *Bacillus* sp. adalah *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Botrytis elliptica*, *Sclerotinium*, *Pythium*, *Cylindrocladium spathiphylli*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Wulff *et al.*, 2002; El-hamsary & Khatatb, 2008; Alamri *et al.*, 2012) sedangkan patogen tular udara yang telah dikendalikan dengan *Bacillus* sp. adalah *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp. dan *Cercospora* sp., (Ongena *et al.*, 2005; Sharma and Kaur, 2010).

Mekanisme antagonis dalam mengendalikan patogen tanaman adalah kompetisi, antibiosis, parasitisme, penghasil enzim pendegradasi dinding sel, penginduksi ketahanan dan pemacu pertumbuhan (Lo, 1998). *B. subtilis* merupakan bakteri yang potensial sebagai agens pengendali hayati, dan beberapa strain efektif menekan penyakit layu bakteri oleh *R. solanacearum* pada beberapa inang (Lemessa and Zeller, 2007; Aliye *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2008). Selain itu, menurut Choudhary and Johri (2008) *Bacillus* spp. dapat sebagai pupuk hayati dan agens pengendali hayati dengan mekanisme antibiosis, sekresi enzim

pelisis, dan penginduksi ketahanan sistemik (*Induced Systemic Resistance* = ISR).

Menurut Haggag and Mohamed (2007), salah satu mekanisme penekanan oleh strain anggota genus *Bacillus* adalah antibiosis, yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan pada kultur *Bacillus* spp. yang ditumbuhkan pada medium secara berlapis dengan bakteri patogen. Antibiosis merupakan mekanisme antagonis dengan menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik atau senyawa mirip antibiotik seperti enzim pelisis, senyawa yang mudah menguap, siderofor, dan substansi toksik lainnya. Antibiotik secara umum didefinisikan sebagai senyawa organik dengan berat molekul rendah, yang dihasilkan sebagai metabolit sekunder dan menghambat pertumbuhan atau aktivitas metabolisme mikroba lain pada konsentrasi rendah. Krebs *et al.* (1998), menyatakan bahwa strain *Bacillus* yang diisolasi dari tanah teridentifikasi sebagai *B. subtilis* mempunyai kemampuan sebagai antibakteri, antijamur, pemacu pertumbuhan tanaman dan penginduksi ketahanan sistemik. Formulasi *B. subtilis* sebagai pengendali hayati dengan produk “FZB24” telah didaftarkan di Jerman sebagai agens penguat tanaman.

Kemampuan antagonis dalam mekanisme antibiosis dapat dibuktikan

dengan mutasi untuk menghilangkan sifat antibiosis dan memilih mutan yang kehilangan sifat antibiosis, kemudian diuji sebagai agens pengendali hayati terhadap *R. solanacearum*. Mutan antibiosis telah kehilangan daya hambatnya dilihat dari ketidakmampuan menghambat patogen, namun sifat yang lain masih sama dengan tipe alaminya yaitu waktu generasi, pola nutrisi, konsistensi koloni, sedangkan metabolit sekundernya berbeda atau bahkan tidak menghasilkan (Lo, 1998). Tujuan penelitian ini adalah untuk 1) menyeleksi mutan antibiosis *B. subtilis* B315 dibandingkan dengan *B. subtilis* B315 tipe alami, 2) mendeteksi sifat antibiosis dari *B. subtilis* B315.

METODE PENELITIAN

Penyiapan mikroba

Mikroba yang digunakan *B. subtilis* B315 diisolasi dari rizosfer kentang sehat di daerah endemik penyakit layu bakteri di Desa Serang Kecamatan Karangreja Kabupaten Purbalingga dengan ketinggian tempat 1200 m dpl. *R. solanacearum* Pr7 diisolasi dari tanaman kentang layu di daerah yang sama. Isolat *B. subtilis* B315 ditumbuhkan pada medium YPGA dan *R. solanacearum* Pr7 pada medium CPG-TTC dan YPGA.

Mutagenesis *B. subtilis* B315 dengan EMS

B. subtilis B315 dibuat mutan untuk memilih mutan yang kehilangan sifat antibiosis. Tujuan pembuatan mutan adalah sebagai salah satu cara untuk membuktikan bahwa *B. subtilis* B315 mempunyai mekanisme antibiosis dalam mengendalikan *R. solanacearum*. Mutagenesis dilakukan dengan menggunakan mutagen kimia EMS (*Ethyl methane sulfonate* = $\text{CH}_3 \text{SO}_3 \text{C}_2\text{H}_5$) merupakan mutagen yang banyak dilaporkan mampu menginduksi mutasi dan memperlihatkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan mutagen kimia yang lain. Cara mutasi dengan EMS dilaksanakan dengan metode menurut Madda (2010). Isolat *Bacillus* sp. B315 dari medium YPGA diambil 1 jarum Ose dimasukkan pada medium TY cair, digojog 1 malam, kemudian 2 ml suspensi diambil dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 6 ml EMS (4 mg/ml dengan cara membuat larutan stok 0,04 g dalam 10 ml air steril), perbandingan suspensi bakteri dengan EMS adalah 1:3. Jadi ada sejumlah 8 ml suspensi *Bacillus* berEMS, kemudian dibagi ke dalam 7 tabung sentrifus-mikro 1,5 ml masing-masing berisi 1 ml untuk perlakuan waktu penggojogan pada suhu 37°C. Perlakuan dalam mutagenesis sebagai berikut: 1) 0 menit, langsung disentrifus dan diresuspensi dengan air steril perbandingan 2:5; 2) 60 menit (50 menit digojog dan 10

menit disentrifus 3000 rpm); 3) 120 menit (110 menit digojog dan 10 menit disentrifus 3000 rpm); 4) 180 menit (170 menit digojog dan 10 menit disentrifus 3000 rpm); 5) 210 menit (200 menit digojog dan 10 menit disentrifus 3000 rpm); 6) 240 menit (230 menit digojog dan 10 menit disentrifus 3000 rpm); 7) 270 menit (260 menit digojog dan 10 menit disentrifus 3000 rpm).

Metode Seleksi mutan

1. Seleksi mutan berdasarkan mekanisme antibiosis

Mutan antibiosis diperoleh dengan cara menyeleksi mutan yang kehilangan sifat antibiosis (tidak menghambat) dan mutan yang menghambat sebagian (Grover *et al.*, 2009), dengan cara menumbuhkan mutan secara dua lapis medium (*double layers method*) dengan *R. solanacearum* menurut metode yang dikemukakan oleh Booth *et al.* (1977). Pengamatan dilakukan terhadap zona hambatan yang terbentuk sehingga dapat dikelompokkan sebagai mutan yang tidak menghambat (*no antagonism*) dan mutan yang menghambat sebagian (*partial antagonism*).

2. Seleksi mutan berdasarkan waktu generasi

Pengujian waktu generasi terhadap *B. subtilis* B315 tipe alami dan mutan antibiosis dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Suspensi *B. subtilis* B315 tipe alami dan mutannya sebanyak 0,1 ml dengan konsentrasi 10^9 cfu/ml masing-masing dimasukkan ke dalam dua erlenmeyer terpisah berukuran 100 ml berisi 20 ml medium YP cair, selanjutnya diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 27°C dengan digojog terus menerus,
- b. Populasi bakteri tersebut dihitung dengan cara masing-masing diambil 10 µl dan diencerkan, selanjutnya 20 µl ditumbuhkan ke dalam medium YPGA dalam cawan petri berukuran 9 cm dengan cara drop metode Miles dan Misra tahun 1938 (Hedges, 2002) untuk penghitungan populasi *B. subtilis* B315 dan mutannya. Setiap tingkat pengenceran didrop 2 kali, dan dilakukan berlawanan dengan arah jarum jam untuk pengenceran yang berbeda. Pada saat suspensi bakteri dimasukkan ke dalam medium cair dihitung sebagai populasi awal, setelah itu populasi dihitung dengan interval waktu empat jam, sebanyak lima kali.

Waktu generasi dihitung dengan rumus yang dikemukakan oleh Goto (1992) sebagai berikut:

$$g = \frac{1}{k} = \frac{T_1 - T_0}{n}$$

$$n = \frac{\log M_1 - \log M_0}{\log 2}$$

dimana:

g = waktu generasi

k = konstanta laju pertumbuhan
T = waktu (jam),
To = waktu pengamatan pertama,
T1 = waktu pengamatan ke dua
n = jumlah generasi
M = populasi bakteri (cfu/ml)
Mo = populasi bakteri pengamatan pertama
M1 = populasi bakteri pengamatan ke dua

3. Seleksi mutan berdasarkan pola nutrisi

Pertumbuhan mutan bakteri apabila membutuhkan nutrisi khusus yang berbeda dengan tipe alaminya dikatakan bersifat auxotrof (Dale, 1998). Mutan antibiosis diuji kemampuan pertumbuhannya pada nutrisi yang sama dengan yang dibutuhkan oleh tipe alaminya dikatakan *non-auxotroph* (bukan auxotrof) berarti tidak membutuhkan nutrisi khusus untuk pertumbuhannya. Cara pengujian yang dilakukan seperti metode yang dikemukakan oleh Nakayama *et al.* (1961) adalah dengan menumbuhkan mutan dan tipe alami *Bacillus* sp. B315 pada medium minimum + L-tryptofan secara terpisah pada cawan petri, diinkubasi selama 22 jam pada suhu 30°C, sel disuspensi, kemudian ditumbuhkan pada medium lengkap diinkubasi selama delapan jam, sel dicuci 2-3 kali, lalu ditumbuhkan pada medium minimum + penicilin 5-50 µl/ml diinkubasi selama 16 jam, lalu disentrifus, dan ditumbuhkan lagi pada medium lengkap, diinkubasi selama 24 jam pada

suhu 33°C selanjutnya diamati dan dibandingkan antara tipe alami dan mutan *Bacillus* sp. B315. Mutan antibiosis menunjukkan pertumbuhan yang sama dengan tipe alami disebut bukan auxotrof, dengan variabel waktu inkubasi, jumlah koloni, serta bentuk dan ukuran koloni.

4. Seleksi mutan berdasarkan koloni

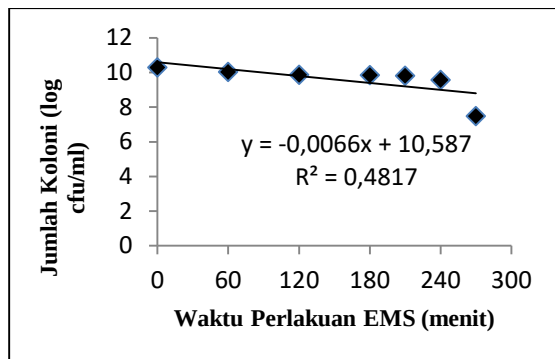
Mutan antibiosis *Bacillus* sp. B315 diseleksi dengan mengamati koloni berdasarkan morfologi koloni meliputi ukuran, bentuk, tepi, elevasi, tekstur dan konsistensi, yang merupakan karakter *B. subtilis* pada medium agar (Aguilar *et al.*, 2007). Pengujian pola nutrisi, waktu generasi dan pengamatan koloni dibandingkan dengan tipe alaminya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

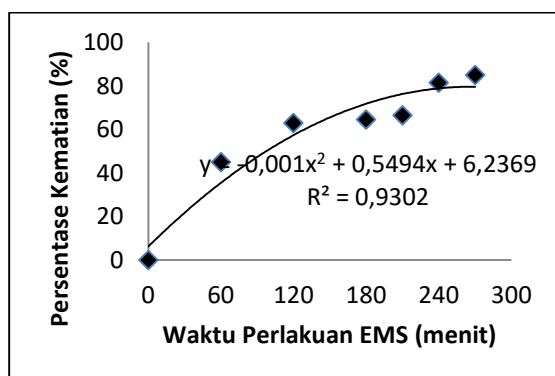
Mutagenesis *Bacillus* sp. B315 dengan EMS dan Seleksi Mutan

Hasil mutagenesis *B. subtilis* B315 dengan EMS menunjukkan jumlah koloni yang terendah pada perlakuan 270 menit sebesar 3×10^7 cfu/ml (Gambar 1). Jumlah koloni mutan ditunjukkan dengan persamaan linier $y = 0,006x + 10,58$ dengan $R^2 = 0,481$. Hasil perhitungan persentase kematian mencapai 85% pada waktu mutagenesis 270 menit, persentase populasi yang bertahan adalah 15%. Berdasarkan persamaan regresi polynomial pada persentase kematian terhadap waktu mutagenesis adalah $y = -0,001x^2 + 0,549x$

+ 6,236 dengan nilai $R^2=0,930$ (Gambar 2), dapat diketahui waktu optimum yang menyebabkan kematian maksimum, yaitu 274,7 menit dengan kematian maksimum 81,7%.



Gambar 1. Jumlah koloni mutan *B. Subtilis* setelah mutagenesis dengan EMS

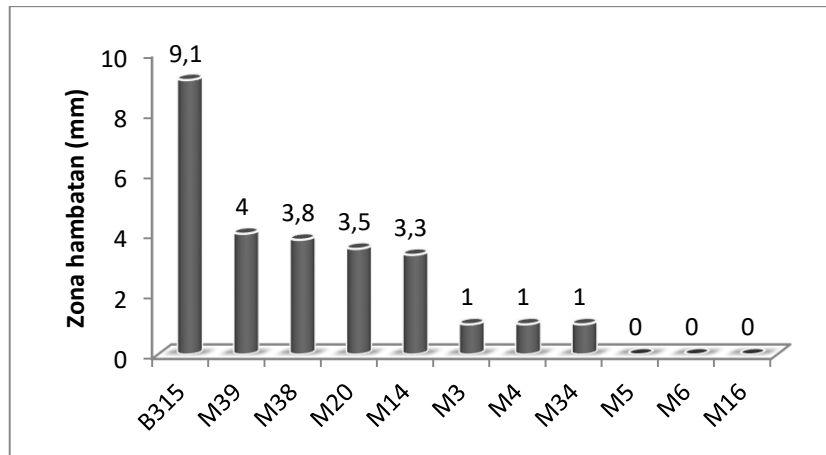


Gambar 2. Persentase kematian B315 *B.subtilis* B315 pada mutagenesis dengan EMS

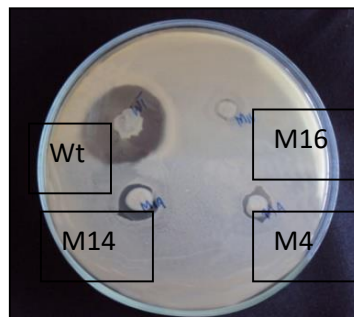
Mutagenesis dengan EMS menghasilkan mutasi titik dengan kerapatan tinggi dapat menekan fertilitas dan kematian. EMS menginduksi mutasi yang terdistribusi secara random (Greene *et al.*, 2003; Supartono *et al.* 2008). EMS ($\text{CH}_3 \text{SO}_3 \text{C}_2\text{H}_5$) merupakan mutagen yang banyak digunakan dalam proses mutasi karena mudah, efektif menyebabkan

perubahan kimia dalam materi genetik, terutama pada mutasi jaringan tanaman, dapat meningkatkan resistensi terhadap hama dan penyakit, mengurangi kandungan asam palmitat, memengaruhi komposisi asam lemak, memengaruhi umur panen dan hasil tanaman (Bhatia *et al.*, 1999). Mutasi *B. subtilis* RP24 dengan EMS kemudian diuji potensi antagonistiknya terhadap jamur *Macrophomina phaseolina* pada medium PDA dihasilkan mutan yang mempunyai kemampuan antagonis sebagian (*partial-antagonism*) dan tidak antagonis (*no-antagonism*) dibandingkan dengan tipe alaminya (*parent strain*). Tipe alami *B. subtilis* RP24 menghasilkan enzim hidrolitik seperti lipase, amylase dan protease, serta hidrogen sianida, sedangkan enzim pendegradasi dinding sel jamur β -1, 3 glukanasase dan chitosanasase tidak terbentuk baik pada mutan maupun tipe alaminya (Grover *et al.*, 2009).

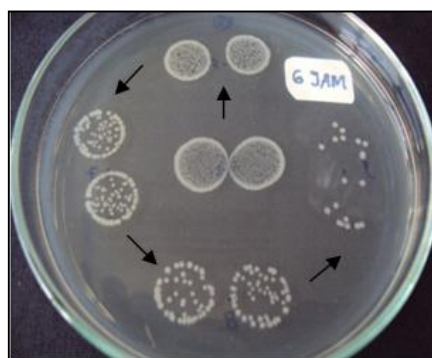
Grover *et al.* (2009) berpendapat bahwa pada konsentrasi EMS 40 $\mu\text{l/ml}$ menghasilkan populasi $4,7 \times 10^7$ cfu/ml dengan persentase kematian 84,3%, sedangkan populasi yang dihasilkan pada penelitian ini adalah 3×10^7 cfu/ml dengan persentase kematian 85% pada perlakuan EMS 4 mg/ml selama 270 menit, dan yang optimum adalah mutagenesis selama 274,7 menit, dengan kematian maksimum 81,7%.



Gambar 3. Penghambatan *B. subtilis* B315 tipe alami dan mutan antibiosis (M) terhadap *R. Solanacearum*. Kelompok I: persentase penghambatan 0%: M5, M6, M16; Kelompok II: persentase penghambatan 10,99%: M3, M4, M34; dan Kelompok III: persentase penghambatan 38-44% : M14, M20, M38, M39.



Gambar 4. Penghambatan *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan antibiosis terpilih terhadap *Ralstonia solanacearum* dalam satu cawan petri. Wt = *Bacillus* sp. B315 tipe alami; M16 = mutan antibiosis dari *Bacillus* sp. B315 nomor mutan 16; M4 = mutan antibiosis dari *Bacillus* sp. B315 nomor mutan 4 dan M14: mutan antibiosis dari *Bacillus* sp. B315 nomor mutan 14



Gambar 5. Perhitungan populasi *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan antibiosis dengan cara drop. Tanda panah menunjukkan tingkat pengenceran dimulai dari tengah 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8}

Berdasarkan hasil seleksi mutan dengan pengujian antagonisme terhadap *R. solanacearum* dibandingkan dengan *B.*

subtilis B315 tipe alami terdapat 40 mutan. Mutan yang menunjukkan hasil penghambatan konsisten terhadap *R.*

solanacearum dikelompokkan menjadi 3. Kelompok I dengan zona hambatan 0 mm ada 11 mutan yaitu M1, M5, M6, M7, M15, M16, M17, M18, M22, M36, M37. Kelompok II dengan zona hambatan 1-3 mm ada 6 mutan yaitu M3, M4, M26, M31, M33, dan M34. Kelompok III dengan zona hambatan >3 mm ada 5 yaitu M19, M20, M27, M38, dan M39. Jadi terdapat 22 mutan yang menunjukkan konsistensi hasil pada 2 kali pengujian penghambatan dan 18 mutan tidak konsisten pada 2 kali pengujian. Penghambatan 3-4 mutan dari masing-masing kelompok mutan antibiosis dan tipe alami terhadap *R. solanacearum* ditunjukkan dalam Gambar 3.

Mutan antibiosis yang kehilangan sifat antibiosis (*no antagonism*) adalah M5, M6 dan M16, dan mutan antibiosis yang menghambat sebagian (*partial antagonism*) adalah M3, M4, M34, M14, M20, M38 dan M39. Menurut Grover *et al.* (2009) mutan antibiosis dibandingkan dengan tipe alaminya akan berubah menjadi tidak menghambat dan menghambat sebagian. Hasil penghambatan antibiosis *B. subtilis* B315 dan mutan antibiosis terpilih dari tiap-tiap kelompok mutan yang diuji dalam satu cawan petri ditunjukkan dalam Gambar 4.

Waktu generasi *B. subtilis* B315

Hasil perhitungan waktu generasi *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan

ditunjukkan dalam Tabel 1. Waktu generasi dihitung berdasarkan populasi setiap 2 jam selama 20 jam. Perhitungan populasi dilakukan secara *drop plate method* menurut Miles dan Misra tahun 1938 (Hedges, 2002), seperti ditunjukkan dalam Gambar 5. Drop suspensi *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan dilakukan mulai dari tengah medium ke atas dan bergerak berlawanan dengan jarum jam pada pengenceran yang bertingkat. Masing-masing pengenceran didrop ulang 2 kali dan setiap drop sebanyak 20 μ l.

Gambar 5 menunjukkan cara perhitungan populasi bakteri pada 6 jam inkubasi dimulai dari tengah cawan petri pada pengenceran ke-4 sampai dengan ke-8 (berlawanan dengan arah jarum jam) sehingga populasinya dapat dihitung pada drop ke-5 yaitu 8×10^{-8} , demikian seterusnya dilakukan setiap 2 jam selama 20 jam. Penggunaan cara drop dalam perhitungan populasi bakteri mempunyai keunggulan efisiensi dalam penggunaan medium dan alat. Kelemahannya adalah perlu ketelitian dan tempat drop (*laminair air flow*) yang betul-betul rata.

Berdasarkan hasil analisis data waktu generasi *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan antibiosis tidak berbeda nyata (Tabel 1). Waktu generasi *Bacillus* sp. B315 adalah 33,84 menit. Hasil penelitian Mayanti and Ariesyady (2010), waktu generasi *B. subtilis* adalah 33,43 menit dan

menurut Baudet *et al.* (1983) 35 menit. Waktu generasi (*doubling time*) menunjukkan bahwa selama 33,84 menit populasi *B. subtilis* B315 meningkat dua kali lipat. Peningkatan populasi dua kali lipat tiap generasi selalu 2n, n menunjukkan jumlah generasi. Peningkatan populasi ini terjadi pada fase pertumbuhan eksponensial (Painter, 1975).

Pola nutrisi

Mutan antibiosis *B. subtilis* B315 dikatakan bukan auxotrof apabila tidak membutuhkan nutrisi khusus untuk pertumbuhannya dan sama dengan tipe

alaminya (Dale, 1998). Pertumbuhan mutan antibiosis dan *B. subtilis* B315 tipe alami dapat diamati dari koloninya baik bentuk, ukuran maupun jumlah koloni pada waktu inkubasi yang sama. Hasil pengujian auxotrof ditunjukkan dalam Tabel 2 dan Gambar 6.

Mutan antibiosis dan tipe alami menunjukkan ukuran koloni yang relatif sama berkisar 2-3 mm pada inkubasi 24 jam, pada suhu 37°C di medium lengkap (ML) sedangkan jumlah koloni mutan M4, M14, M16 dan M20 adalah pada kerapatan koloni yang sama yaitu 10⁹ cfu/ml.

Tabel 1. Waktu generasi *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan antibiosis

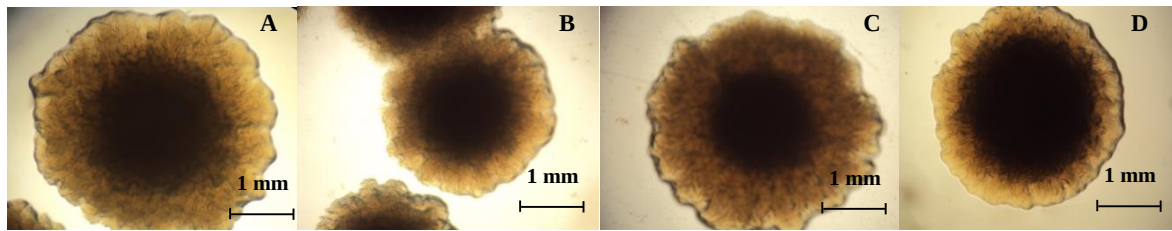
<i>Bacillus subtilis</i> B315	Waktu generasi (menit)
Tipe alami	33,84a
Mutan M3 (K II)	33,58a
Mutan M4 (K II)	34,12a
Mutan M6 (K I)	33,83a
Mutan M14 (KIII)	32,62a
Mutan M16 (K I)	32,83a
Mutan M20 (K III)	33,83a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%. KI = Kelompok I: persentase penghambatan 0%: M5, M6, M16; KII = Kelompok II: persentase penghambatan 10,99%: M3, M4, M34; KIII = Kelompok III: persentase penghambatan 38-44%: M14, M20, M38, M39; M = mutan antibiosis, angka di belakang M menunjukkan nomor mutan.

Tabel 2. Uji auxotrof *B. subtilis* B315 tipe alami dan mutan antibiosis

<i>Bacillus</i> sp. B315	Jumlah koloni (cfu/ml, inkubasi 24 jam, 37°C pada ML)	Ukuran koloni (mm)
Tipe alami	46. 10 ⁹	2-3
Mutan M3 (K II)	tt	-
Mutan M4 (K II)	67. 10 ⁹	2,5
Mutan M6 (K I)	tt	-
Mutan M14 (KIII)	18. 10 ⁹	1,9
Mutan M16 (K I)	8. 10 ⁹	2,1
Mutan M20 (K III)	75. 10 ⁹	1,4

Keterangan: ML: medium lengkap, tt: tidak terhitung



Gambar 6. Koloni *Bacillus* sp. B315 tipe alami dan mutan antibiosis. A. *Bacillus* sp. B315 tipe alami; B. mutan antibiosis M16; C. Mutan antibiosis M4 dan D. Mutan antibiosis M14

Mutan M3 dan M6 yang secara berturut-turut termasuk kelompok mutan II dan I menunjukkan jumlah koloni yang tidak terhitung pada pengenceran 10^{-8} .

Mutan terpilih M4, M16 dan M14 menunjukkan bentuk koloni yang sama dengan tipe alaminya, dan ukuran relatif lebih kecil dibanding dengan tipe alaminya. Berdasarkan jumlah koloni, bentuk koloni, dan ukuran koloni pada mutan antibiosis yang ditumbuhkan pada medium lengkap maka mutan antibiosis dikatakan bersifat bukan auxotrof.

Profil koloni mutan dan tipe alami sama dalam bentuk dan sedikit berbeda dalam ukuran, tepi koloni *undulate* (sedikit bergerigi) sama dengan *B. subtilis* yang dikemukakan oleh Branda *et al.* (2004; Lopez *et al.*, 2009; Todar, 2009).

Koloni *B. subtilis* B315 setelah mutasi, dan replika koloni serta uji konsistensi koloni didasarkan pada pengamatan morfologi koloni, bentuk bulat, tepi *undulate*, permukaan rata (*flat*), konsistensi kering, tidak bersinar atau suram (*dull*), dan membentuk biofilm. Joo

et al. (2007; Todar, 2009) menyebutkan bahwa ciri koloni *B. subtilis* adalah berbentuk sirkular, elevasi *flat*, tepi *undulate*, permukaan *smooth* dan *opaque* dengan pigmentasi putih, krem.

Seleksi masing-masing kelompok mutan dilakukan untuk dapat menentukan mutan yang kehilangan sifat antibiosis, dan mutan yang masih mampu menghambat. Berdasarkan uji penghambatan terhadap *R. solanacearum* dan uji konsistensi, maka pada masing-masing kelompok mutan terpilih 2 mutan yaitu kelompok I adalah mutan M6 dan M16, kelompok II M3 dan M4, dan kelompok III adalah M14 dan M20, yang akan dilanjutkan pengujiannya di rumah kaca.

Mutagenesis dengan EMS dapat memengaruhi proses metabolisme dan pertumbuhan bakteri. Greene *et al.* (2003) mengemukakan bahwa mutagenesis dengan EMS mempunyai mekanisme alkilasi yaitu perubahan suatu pasangan basa dengan menambah grup alkil yaitu etil, sehingga terjadi kesalahan pasangan (*mispairing*) yang menyebabkan terjadi

perubahan kimia dalam materi genetik, sehingga memengaruhi pertumbuhan. Penambahan grup alkil pada beberapa posisi keempat basa berkaitan dengan penambahan oksigen yang secara langsung membentuk *mispairing* dengan *thymine* (El-Bondkly and Keera, 2007).

KESIMPULAN

1. Seleksi mutan antibiosis *B. subtilis* B315 dilakukan berdasarkan karakter antibiosis, waktu generasi, pola nutrisi, dan koloni.
2. Mutan antibiosis *B. subtilis* B315 yang kehilangan sifat antibiosis adalah mutan M16, yang tidak menghambat *R. solanacearum* secara antibiosis, waktu generasi 32,83 menit yang senilai dengan *B. subtilis* B315 tipe alami 33,84 menit, pola nutrisi bukan auxotrof, dan karakter koloni yang sama dengan *B. subtilis* B315 tipe alami hanya berbeda ukurannya.
3. *B. subtilis* B315 menunjukkan mekanisme antibiosis terhadap *R. solanacearum* sedangkan mutan antibiosis M16 tidak menunjukkan sifat antibiosis disebabkan oleh mutagen EMS dengan mekanisme alkilasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana dari Beasiswa BPPS Program Doktor tahun

2009-2012, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada DIKTI.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar, C., H. Vlamakis, R. Losick and R. Kolter. 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr. Opin Microbiol.* 10(6): 638-643
- Alamri, S., M. Hashem and Y.S. Mostafa. 2012. In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Sci.* 17(4): 155-167
- Aliye, N., Fininsa, C., and Hiskias, Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biol. Control* 47: 282-288.
- Bathia, C.R., K. Nichterlein and M. Maluszynski. 1999. Oilseed cultivars developed from induced mutations and mutations altering fatty acid composition. International Atomic Energy Agency. ISSN 1011-2618 No 11: 1-38
- Baudet, C., J.N. Barbotin and J.G. Michel. 1983. Growth and Sporulation of Entrapped *Bacillus subtilis* Cells. *Applied and Environmental Microbiology.* 45(1): 297-301
- Booth, S. J., Johnson, J. L. and Wilkins, T. D. 1977. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob Agents Chemother* 11, 718-724.
- Branda, S.S., J.E.G. Pastor, E. Dervyn, S.D. Ehrlich, R. Losick and R.

- Kolter. 2004. Genes Involved in Formation of Structured Multicellular Communities by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 186(12): 3970-3979
- Choudhary, D.K. and B.N. Johri. 2008. Interaction of *Bacillus* spp. and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). (On-line). http://www.sciencedirect.com/science?_ob=articleURL. diakses tanggal 28 Februari 2009.
- Dale, J.W. 1998. *Molecular Genetics of Bacteria*. 3th ed. John Wiley and Sons. New York. 310 p.
- El-Bondkly, A.M. and A. A. Keera. 2007. UV- and EMS- induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roquefortii*. *Arab J. Biotech.*10(2): 241-248.
- El-hamsary, O.I.M. and A.A Khatatab. 2008. Evaluation of antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and their fusant against *Fusarium solani*. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*. 2(2): 24-29
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, INC. New York. 339 pp.
- Greene, E.A., C.A. Codomo, N.E. Taylor, J.G. Henikoff, B.J. Till, S.H. Reynolds, L. C. Enns, C. Burtner, J. Johnson, A.R. Odden, L.Comai and S. Henikoff. 2003. Spectrum of Chemically Indiced Mutations From a Large-Scale Reverse-Genetic Screen in Arabidopsis. *Genetics* 164: 731-740
- Grover, M., L. Nain and A.K. Saxena. 2009. Comparison between *Bacillus subtilis* RP24 and its antibiotic-defective mutants. *World.J. Microbiol.Biotechnol.* 25: 1329-1335
- Haggag, W.M., and H.A.A. Mohamed. 2007. Biotechnological Aspects of Microorganism Used in Plant Biological Control. *Am-Eurasian Journal Sustainable Agriculture*. I (1): 7-12
- Hedges, A.J. 2002. Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International Journal of Food Microbiology* 76 (3): 207–214.
- Ji, X.L., Lu, G.B., Gai, Y.P., Zheng, C.C., and Mu, Z.M. (2008). Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain FEMS. *Microbiol. Ecol.* 65: 565–573.
- Joo, M.H., S.H. Hur, Y.S. Han and J.Y. Kim. 2007. Isolation, identification, and characterization of *Bacillus* strains from the Traditional Korean Soybean-fermented Food, *Chungkookjang*. *J. App. Biol. Chem.* 50(4): 202-210
- Krebs, B., B. Hoding, S. Kubart, M.A. Workie, H. Junge, G. Schmiedeknecht, R. Grosch, H. Bochow, and M Hevest. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. 1. Activities and Characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (2): 181-197
- Lemessa, F., and Zeller, W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biol. Control* 42: 336–344.
- Li, S. N. Zhang, Z. Zhang, J. Luo, B. Shen, R. Zhang and Q. Shen. 2012. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. *Journal of International Society of Soil Science*. Published online 5 Juli 2012
- Lo, C.T. 1998. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. *Plant Pathology Bulletin* 7: 155-166

- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. 2009. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 74 (3), 609-618
- Madda, S. 2010. Investigations on Bioproduction, Purification and Characterization of Medicinally Important L-Asparaginase enzyme using a newly Isolated Bacterial Species. On-line <http://www.producing+MNTGmutantandpf=p>. Diakses tanggal 14 Januari 2012.
- Mayanti, B. and H.D. Ariesyady. 2010. Identification of Commercial-seed bacteria for paint liquid waste treatment. (On-line). http://www.ftsi.itb.ac.id/kk/rekayasa_air_dan_limbah_cair/wp-content. Diakses tanggal 12 Desember 2012
- Nakayama, K, S.Kitada, Zenroku, Sato, and S. Kinoshita. 1961. Induction of Nutritional Mutants of Glutamic Acid Bacteria and Their Amino Acid accumulation. *Journal. Gen. Applied Microbiology*. 7(1): 41-51
- Ongena,M., F. Duby, E. Jourdan, T. Beaudry, V. Jadin, J. Dommes, and P. Thonart. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(5): 692-698
- Painter, P.R. 1975. Generation Times of Bacteria. *Journal of General Microbiology* 89: 217-220
- Todar, K. 2009. The Genus *Bacillus*. (On-line). <http://www.textbookbacteriology.net/Bacillus.html>. Diakses tanggal 2 Juni 2010.
- Sharma, S., and M. Kaur. 2010. Antimicrobial activities of rhizobacterial strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* strain isolated from rhizosphere soil of carnation (*Dianthus caryophyllus* cv. Sunrise). *Indian J. Microbiol* 50: 229-232
- Supartono, N. Wijayanti, L Herlina and E. Ratnaningsih. 2008. Mutation on *Bacillus subtilis* BAC4 using Acridine Orange as an effort for Increasing antibiotic production. *Indon. J. Chem*. 8(2): 258-263
- Wulff, E.G., C.M. Mguni, C.N. Mortensen, C.L. Keswani, and J. Hockenhull. 2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*. 108 (4): 317-325