

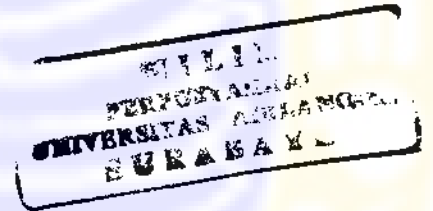
**UJI POTENSIAL PENGHAMBATAN
BIOSURFAKTAN *Bacillus subtilis* 3KP TERHADAP
Xanthomonas campestris DAN *Fusarium solanii***

SKRIPSI

MPB 57/05

Ast

u



KURNIA FUJI ASTUTIK

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**UJI POTENSIAL PENGHAMBATAN BIOSURFAKTAN
Bacillus subtilis 3KP TERHADAP *Xanthomonas campestris*
DAN *Fusarium solanii***

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains
Bidang Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam Universitas Airlangga Surabaya**

**Oleh :
Kurnia Fuji Astutik
NIM. 080112302**

Tanggal Lulus : 18 Agustus 2005

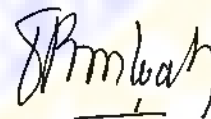
Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



**Dr. Ni'matuzahroh
NIP. 152 011 697**

Pembimbing II,



**Tri Nurharivati, S.Si., M.Kea.
NIP. 132 086 389**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

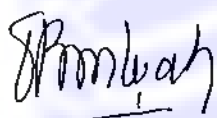
Judul : Uji Potensial Penghambatan Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP Terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*
Penyusun : Kurnia Fuji Astutik
NIM : 080112302
Tanggal Ujian : 18 Agustus 2005

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,

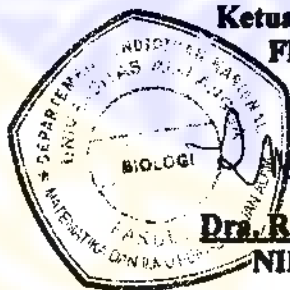
Pembimbing II,

Dr. Ni'matuzahroh
NIP. 132 011 697


Tri Nurharivati, S.Si, M.Kes.
NIP. 132 086 389

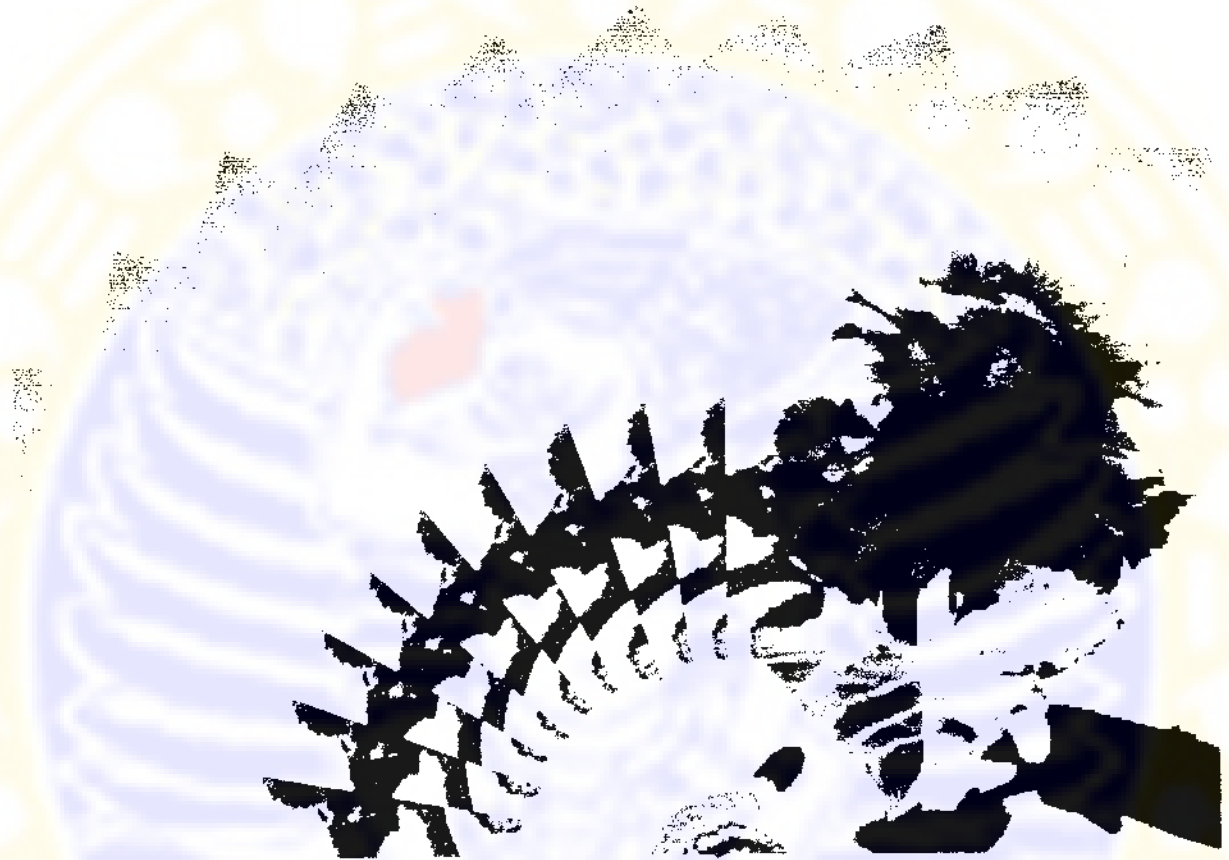
Mengetahui :

**Ketua Jurusan Biologi
FMIPA Unair,**



Dra. Rosmanida, M.Kes.
NIP. 131 126 075

ADLM Perpustakaan Universitas Airangga
"Karena sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan"
(QS. Al-Insyirah: 5)



"Cukuplah Allah menjadi Penolong kami
dan Allah adalah sebaik-baik Pelindung."
(QS. Ali 'Imran 173)

Terima kasih,

*Telah mengajarku membedakan yang benar dan yang salah
Mendorongku untuk mempertahankan mimpi-mimpiku
Menunjukkan padaku untuk tidak terpengaruh oleh rintangan
Dan untuk mengubah kebingunganku menjadi senyuman*

Terima kasih,

*Telah mengatakan bahwa kalian menyayangiku
Menunjukkan betapa istimewanya cinta itu
Menghapus air mataku kala aku sedih
Dan untuk menenangkanku saat aku ingin marah*

Terima kasih,

*Telah membantu sesama dengan perbuatan baik kalian
Mengajarku bahwa aku pun pasti menolong sesama
Memelukku ketika aku merasa sunyi
Dan membisikkan padaku "Aku sayang kamu"*

Terima kasih,

*Bapak, Ibu, Keluargaku dan Sahabat-Sahabatku,
Atas segala yang kalian lakukan untukku
Entah bagaimana jadinya diriku tanpa kalian*

*Persembahanku untuk
Bapak dan Ibu tercinta*

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan seijin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Univeritas Airlangga.

Kurnia Fuji Astutik, 2005, Uji Potensial Penghambatan Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP Terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*, SKRIPSI, dibawah bimbingan Dr. Ni'matuzahroh dan Tri Nurhariyati, S.Si, M.Kes, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Biosurfaktan *Bacillus subtilis* mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi penghambatan dan nilai MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap mikroba fitopatogen (*Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 16 perlakuan dan 4 kali pengulangan pada setiap perlakuan. Biosurfaktan diujikan pada berbagai konsentrasi (0, 100, 400, 700, 1000, 4000, 7000 dan 10000) ppm. Kemampuan penghambatan pertumbuhan dan nilai MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) biosurfaktan terhadap mikroba fitopatogen diukur menggunakan metode difusi dan dilusi. Data diameter daerah penghambatan dianalisis secara statistik dengan ANAVA satu arah dan uji LSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP menghambat pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*. Konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP yang berbeda berpengaruh terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*. Penghambatan terbesar dari biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terdapat pada *Fusarium solanii* dengan diameter daerah penghambatan sebesar (3.5875 ± 0.069) mm pada konsentrasi 10.000 ppm. Penghambatan terkecil dari biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terdapat pada *Fusarium solanii* dengan diameter daerah penghambatan sebesar (0.095 ± 0.012) mm pada konsentrasi 1000 ppm dan *Xanthomonas campestris* dengan diameter daerah penghambatan sebesar (0.095 ± 0.0129) mm pada konsentrasi 100 ppm. Nilai MIC biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* sebesar 1000 ppm dan terhadap *Fusarium solanii* sebesar 4000 ppm.

Kata kunci : biosurfaktan, *Bacillus subtilis* 3KP, uji penghambatan, *Xanthomonas campestris*, *Fusarium solanii*

Kurnia Fuji Astutik, 2005, Inhibition Potential Test of *Bacillus subtilis* 3KP Biosurfactant against *Xanthomonas campestris* and *Fusarium solanii*, The study was guided by Dr. Ni'matuzahroh and Tri Nurhariyati, S.Si, M.Kes, Biology Departement, Faculty of Mathematics and Sciences , Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

Biosurfactant of *Bacillus subtilis* 3KP had an ability to inhibit microbial growth. This research was done to know the inhibition potential and MIC (Minimal Inhibitor Concentration) value of *Bacillus subtilis* 3KP biosurfactant against phytopathogenic microbial (*Xanthomonas campestris* and *Fusarium solanii*). This research used randomized complete design, 16 treatments and four replications for every treatments. Biosurfactant was tested in different concentrations (0, 100, 400, 700, 1000, 4000, 7000, and 10000) ppm. Inhibition potential test and MIC (Minimal Inhibitor Concentration) values were measured using diffusion and dilution methods. The data of inhibition zone diameter was analyzed statisticly using ANAVA one way and LSD test. The results showed that *Bacillus subtilis* 3KP biosurfactant could inhibit *Xanthomonas campestris* and *Fusarium solanii* growth. Different concentrations of *Bacillus subtilis* 3KP biosurfactant influenced inhibition zone of *Xanthomonas campestris* and *Fusarium solanii* growth. The biggest inhibition of *Bacillus subtilis* 3KP biosurfactant was *Fusarium solanii* at 10.000 ppm with inhibition zone diameter about (3.5875 ± 0.069) mm. The smallest inhibition of *Bacillus subtilis* 3KP biosurfactant was *Fusarium solanii* at 1000 ppm with inhibition zone diameter about (0.095 ± 0.012) mm and *Xanthomonas campestris* at 100 ppm with inhibition zone diameter about (0.095 ± 0.0129) mm. Minimal Inhibitor Concentration of *Bacillus subtilis* 3KP biosurfactant against *Xanthomonas campestris* was 1000 ppm and *Fusarium solanii* was 4.000 ppm.

Key words : biosurfactant, *Bacillus subtilis* 3KP, inhibition test, *Xanthomonas campestris*, *Fusarium solanii*

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah Subhanahuwata'alla, Robb seru sekalian alam, atas segala rahmat, ridlo dan karunia-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "**Uji Potensial Penghambatan Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP Terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii***". Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di bidang Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya.

Selama proses pengerjaan penelitian ini dan penyusunan skripsi, penyusun menyadari bahwa naskah skripsi ini tidak akan terwujud tanpa adanya do'a, bantuan dan dukungan dari banyak pihak. Dalam kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih sebanyak-banyaknya kepada semua pihak yang turut berperan dalam proses penyelesaian skripsi ini.

Penyusun menyadari keterbatasan kemampuan dan pengetahuan yang dimiliki penyusun sehingga skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penyusun mohon saran dan kritik guna penyempurnaanya. Akhirnya penyusun berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Agustus 2005

Penyusun

UCAPAN TERIMA KASIH

Proses penyusunan skripsi ini tidak akan dapat terselesaikan tanpa bantuan dari semua pihak yang turut membantu. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Ni'matuzahroh sebagai pembimbing I atas ilmu, bimbingan, arahan, semangat, kesabaran, perhatian, hikmah, serta pelajaran "ikhlas" nya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Ibu Tri Nurhariyati, S.Si, M.Kes sebagai pembimbing II atas ilmu, arahan, bimbingan, kesabaran dan perhatiannya kepada penulis selama ini.
3. Bapak Drs. Noer Moehammadi, M.Kes sebagai penguji III dan dosen wali (2004 –2005) atas ilmu, bimbingan, dan perhatiannya kepada penulis.
4. Ibu Dra. Listijani Suhargo, M.Si sebagai penguji IV atas saran dan perhatiannya.
5. Bapak Drs. Agus Supriyanto, M.Kes dan Bapak Drs. Moch. Affandi, M.Si atas perhatian, saran dan ilmunya.
6. Kedua Orang tua (Bapak dan Ibu) yang telah memberikan segalanya untuk penulis, semoga Allah SWT memuliakan beliau berdua.
7. Bapak Drs. Eko Prihiyantoro, M.Kes sebagai dosen wali (2001 – 2004) atas kesabarannya.
8. Bapak, ibu dosen sekalian yang telah membagi pengalaman dan ilmu-ilmunya kepada penulis.
9. Seluruh keluarga (Cak Ali, Neng Yuli, Arin, Suci) atas bantuannya.
10. Seluruh karyawan "pak Eko dan bu Indah, mas Yanto, mas Eko, pak Ji, pak Ni, pak Nar, mbak Wuri, mbak Yatminah dan mbak Ari" atas segala bantuannya.
11. Teman-teman terbaik Bio '01 dan penghuni laboratorium Mikrobiologi (Azi, qoqom, ana, cece, ayu, happy, tika, ate, desi, erni+anita+eka

“budiarti”, ani, jemy, indri, lindo, dini, dek ”endah, lisa, ratih, shinta”) yang senantiasa berbagi dalam suka dan duka.

12. Seluruh warga UKMKI, SANSA, HIMBIO dan BEM UNAIR (Pebz, Gusmam, kak Budi, m Nyta, m Nura, Iwan, Manto, Feru, Ipul, Sulis, Mayang, Nana, Agus) yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi.
13. Semua pihak yang telah membantu kelancaran dalam penyusunan dan menyelesaikan skripsi ini.

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI | iii |
| ABSTRAK | iv |
| ABSTRACT | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Permasalahan | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3 Asumsi Penelitian | 4 |
| 1.4 Hipotesis Penelitian | 5 |
| 1.4.1 Hipotesis kerja | 5 |
| 1.4.2 Hipotesis statistika | 5 |
| 1.5 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.6 Manfaat Penelitian | 6 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 7 |
| 2.1 Tinjauan Umum Biosurfaktan | 7 |
| 2.2 Jenis dan Mikroba Penghasil Biosurfaktan | 8 |
| 2.3 Aplikasi Biosurfaktan | 9 |
| 2.3.1 Aplikasi biosurfaktan secara umum | 9 |
| 2.3.2 Aplikasi biosurfaktan di bidang pertanian | 10 |
| 2.4 Produksi Biosurfaktan oleh <i>Bacillus subtilis</i> | 11 |
| 2.5 Karakterisasi Biosurfaktan oleh <i>Bacillus subtilis</i> | 12 |
| 2.6 Tinjauan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP | 13 |
| 2.7 Tinjauan Mikroba Uji | 14 |
| 2.7.1 Tinjauan <i>Xanthomonas campestris</i> | 14 |

| | | |
|----------------------------------|--|----|
| 2.7.2 | Tinjauan <i>Fusarium solanii</i> | 15 |
| 2.8 | Tinjauan Antimikroba..... | 16 |
| 2.9 | Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Mikroorganisme (Antimikroba)..... | 17 |
| 2.10 | Potensial Penghambatan Surfaktin terhadap Mikroba..... | 18 |
| 2.11 | Penentuan Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Mikroorganisme (Antimikroba)..... | 21 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | | 23 |
| 3.1 | Tempat dan Waktu Penelitian..... | 23 |
| 3.2 | Bahan dan Alat Penelitian..... | 23 |
| 3.2.1 | Bahan..... | 23 |
| 3.2.2 | Alat..... | 24 |
| 3.3 | Metode Penelitian..... | 24 |
| 3.3.1 | Rancangan penelitian..... | 24 |
| 3.3.2 | Variabel penelitian..... | 24 |
| 3.4 | Cara Kerja..... | 25 |
| 3.4.1 | Pembuatan media air mineral sintetis (AMS)..... | 25 |
| 3.4.2 | Pembuatan stok bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP..... | 25 |
| 3.4.3 | Perbanyakan bakteri dalam <i>nutrient broth</i> | 25 |
| 3.4.4 | Pembuatan prekultur bakteri..... | 26 |
| 3.4.5 | Pembuatan kultur bakteri..... | 26 |
| 3.4.6 | Isolasi dan pemisahan biosurfaktan dengan fraksinasi amonium sulfat..... | 26 |
| 3.4.7 | Dialisis..... | 28 |
| 3.4.8 | Uji aktivitas biosurfaktan..... | 28 |
| 3.4.9 | Pembuatan larutan biosurfaktan..... | 29 |
| 3.4.10 | Penentuan aktivitas antimikroba..... | 29 |
| 2.4.10.1 | Metode cakram kertas (<i>disk diffusion method</i>)..... | 29 |
| 2.4.10.2 | Metode pengenceran dalam tabung (<i>tube dilution method</i>)..... | 31 |
| 3.5 | Analisis Data..... | 33 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | | 34 |
| 4.1 | Karakteristik Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP..... | 34 |
| 4.2 | Uji Penghambatan Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP..... | 35 |
| 4.2.1 | Metode cakram kertas (<i>disc diffusion method</i>)..... | 35 |
| 1.2.2 | Metode pengenceran dalam tabung (<i>tube dilution method</i>)..... | 40 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | | 44 |
| 5.1 | Kesimpulan..... | 44 |
| 5.2 | Saran..... | 45 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | | 46 |

DAFTAR TABEL

| Nomor | Judul Tabel | Halaman |
|-------|---|---------|
| 2.1 | Jenis Biosurfaktan dan Mikroorganisme Penghasil Biosurfaktan | 9 |
| 2.2 | Aktivitas Antimikroba Permukaan Aktif Lipopeptida dari <i>Bacillus licheniformis</i> Melawan Yeast, Bakteri dan Kapang pada Agar Difusi dan Dilusi | 19 |
| 2.3 | Potensi Penghambatan Surfaktin dan Lichenisin A Terhadap Berbagai Mikroba..... | 20 |
| 4.1 | Diameter Daerah Penghambatan Pertumbuhan <i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i> dengan Beberapa Konsentrasi Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP | 36 |
| 4.2 | Data Nilai Log TPC (<i>Total Plate Count</i>) dan Visualisasi Dilusi dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP Terhadap <i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i> | 41 |
| 4.3 | Nilai MIC Produk Kasar Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP Terhadap <i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i> | 42 |

DAFTAR GAMBAR

| Nomor | Judul Gambar | Halaman |
|-------|---|---------|
| 2.1 | Struktur Molekul Biosurfaktan..... | 7 |
| 2.2 | Struktur Lipopeptida Siklik Surfaktin <i>Bacillus subtilis</i> | 12 |
| 2.3 | Mekanisme Penghambatan Berbagai Senyawa Metabolit Sekunder Mikroorganisme..... | 21 |
| 3.1 | Fraksinasi Supernatan Kultur dengan Amonium Sulfat | 27 |
| 3.2 | Uji Penghambatan dengan Metode Cakram Kertas..... | 30 |
| 3.3 | Uji Penghambatan dengan Metode Dilusi | 32 |
| 4.1 | Diagram Batang Diameter Daerah Penghambatan Pertumbuhan <i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i> dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP..... | 36 |
| 4.2 | Grafik Nilai Log TPC (<i>Total Plate Count</i>) <i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i> pada Uji Dilusi dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP | 41 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Judul |
|-----------------|--|
| 1 | Cara Kerja Persiapan Dialisis dan Gambar Alat Dialisis |
| 2 | Konversi Konsentrasi Supernatan pada Uji Pendahuluan Cakram Kertas |
| 3 | Aktivitas Emulsi Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP pada Minyak Uji dan Foto Stabilitas Emulsi pada Minyak Uji |
| 4 | Komposisi Media Uji Penghambatan Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP |
| 5 | Hasil Analisis Varian (ANOVA) Satu Arah Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan Terhadap <i>Xanthomonas campestris</i> |
| 6 | Hasil Analisis Varian (ANOVA) Satu Arah Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan Terhadap <i>Fusarium solanii</i> |
| 7 | Foto Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP dan Kultur Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP |
| 8 | Foto Mikroba Uji (<i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i>) |
| 9 | Foto Hasil Liofilisasi Produk Biosurfaktan dan Larutan Biosurfaktan |
| 10 | Foto Uji Pendahuluan Penghambatan Biosurfaktan Dalam Supernatan Terhadap <i>Xanthomonas campestris</i> |
| 11 | Foto Diameter Daerah Penghambatan Biosurfaktan Berbagai Konsentrasi Terhadap <i>Xanthomonas campestris</i> |
| 12 | Foto Diameter Daerah Penghambatan Biosurfaktan Berbagai Konsentrasi Terhadap <i>Fusarium solanii</i> |
| 13 | Foto Hasil Dilusi Biosurfaktan Berbagai Konsentrasi Terhadap <i>Xanthomonas campestris</i> dan <i>Fusarium solanii</i> |
| 14 | Foto Alat – Alat Penelitian |

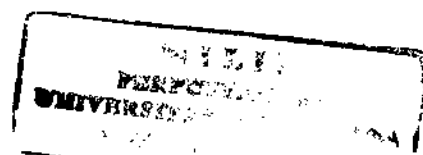
BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Keadaan produktifitas pertanian di Indonesia saat ini belum dapat mengiringi pertumbuhan penduduk yang terus meningkat. Beberapa faktor yang menyebabkan penurunan produktifitas pertanian di Indonesia antara lain: menurunnya kualitas lahan pertanian akibat bencana alam, erosi, residu pestisida, pencemaran logam berat serta serangan penyakit pada tanaman (Anonim, 2003).

Kerusakan hasil pertanian bisa disebabkan oleh berbagai serangan hama seperti serangga, mamalia, virus, protozoa, nematoda, kapang dan bakteri. Kondisi pertanian di daerah tropis yang panas dan lembap, termasuk sebagian besar daerah di Indonesia, memungkinkan terjadinya serangan mikroorganisme seperti kapang dan bakteri (Semangun, 2001). Kapang dan bakteri penyebab penyakit pada tanaman beberapa diantaranya : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Oidium*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* dan *Agrobacterium*. Khaeruni (2001) melaporkan bahwa akibat serangan *Xanthomonas campestris* pv *oryzae* Jepang mengalami kerugian penurunan hasil pertanian berupa padi sebesar 20 – 50%. *Xanthomonas campestris* lebih sering menyerang tanaman di daerah tropis dan subtropis (Monteiro *et al.*, 2005). Kapang merupakan jenis terbanyak dari mikroba patogen pada tanaman (Abadi, 2003; Bais *et al.*, 2004). Serangan *Fusarium solanii* pada kacang – kacangan mengakibatkan berkurangnya hasil produksi kacang – kacangan sebesar 10 – 20%



atau bahkan lebih dari itu yang menyebabkan kerugian besar di bidang pertanian (Anonim, 2000). Menurut Duriat (2003) turunnya produksi cabai di Indonesia dari 12 – 20 ton menjadi 5,5 ton salah satunya disebabkan oleh serangan *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* dan *Fusarium solanii*.

Pengendalian penyakit tanaman di Indonesia selama ini masih banyak mengandalkan penggunaan pestisida. Penggunaan pestisida tersebut mempunyai dampak terhadap resistensi hama tanaman dan pencemaran, sehingga penggunaan pestisida perlu dikurangi (Abadi, 2003; Monteiro *et al.*, 2005). Oleh karena itu pengembangan pengendalian hayati perlu dikembangkan dan diharapkan menjadi alternatif pengendalian penyakit tanaman (Khaeruni, 2001). Keuntungan pengendalian hayati antara lain : lebih aman karena tidak terakumulasi dalam rantai makanan, dan dapat digunakan secara bersama – sama dengan pengendalian yang sudah ada (Suwanto, 1994).

Saat ini sedang berkembang penelitian yang mengarah pada pengendalian hayati dengan menggunakan berbagai produk dari mikroorganisme seperti biosurfaktan. Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Biosurfaktan bersifat amfifatik, yang terdiri dari komponen hidrofilik dan hidrofobik (Koch *et al.*, 1991). Surfaktin merupakan biosurfaktan jenis lipopeptida dari *Bacillus subtilis* yang mampu digunakan sebagai pengendali hayati melawan bakteri fitopatogen seperti *Erwina*, *Pseudomonas*, dan *Xanthomonas campestris* (Bais *et al.*, 2004 ; Monteiro *et al.*, 2005). Selain itu surfaktin juga dapat meningkatkan aktivitas antifungi / antikapang melawan *Trichophyton menthogrophytes*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solanii* dan

kapang yang lain (Lang and Wagner, 1996 ; Monteiro *et al.*, 2005). Biosurfaktan *Bacillus subtilis* mampu menghambat pertumbuhan mikroba fitopatogen dengan konsentrasi berbeda-beda, diantaranya : *Fusarium solanii* 75 µg/ml dan *Xanthomonas campestris* 25 µg/mL (Lang and wagner., 1996; Bais *et al.*, 2004).

Produk biosurfaktan yang telah dipasarkan selama ini seperti surfaktin bukan merupakan produk asli Indonesia. Eksplorasi potensi keanekaragaman mikroba penghasil biosurfaktan, isolasi biosurfaktan serta uji potesial penghambatan biosurfaktan merupakan upaya untuk mengungkap potensi biosurfaktan mikroba dari Indonesia. Pada penelitian terdahulu telah diisolasi *Bacillus subtilis* 3KP dari kali Donan Cilacap yang menghasilkan produk biosurfaktan. *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada molase mampu memproduksi biosurfaktan dan dapat mengisolasi biosurfaktan dengan metode pengendapan amonium sulfat 60% jenuh (Sasongko, 2003). Biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP diketahui mempunyai kesamaan gugus fungsi dengan biosurfaktan komersial (surfaktin) (Yuliani, 2004).

Potensi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dalam pengendalian hama tanaman membutuhkan penelitian tentang uji potensial penghambatan produk biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dan nilai MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) biosurfaktan tersebut terhadap mikroba uji. Kemampuan penghambatan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP diketahui dengan diameter daerah penghambatan pada biakan mikroba uji. *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* digunakan sebagai mikroba uji karena keduanya merupakan agen fitopatogen yang menyebabkan kerugian besar di bidang

pertanian (Duriat, 2003). Penelitian potensial penghambatan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* diharapkan mampu mengungkap potensi dari produk biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP dari Indonesia untuk dapat diaplikasikan dalam bidang pertanian.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang permasalahan diatas, maka dapat diajukan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dapat menghambat pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* ?
2. Apakah konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP yang berbeda berpengaruh terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* ?
3. Berapa nilai MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* ?

1.3 Asumsi Penelitian

Penelitian ini didasarkan pada asumsi bahwa *Bacillus subtilis* 3KP menghasilkan biosurfaktan jenis lipopetida yang mempunyai aktivitas penghambatan. Kemampuan penghambatan biosurfaktan berbeda bergantung pada jenis mikroba dan konsentrasi biosurfaktan yang diujikan. Perbedaan kemampuan

penghambatan ditunjukkan dengan berbedanya diameter daerah penghambatan di sekitar cakram kertas uji.

1.4 Hipotesis Penelitian

1.4.1 Hipotesis kerja

Jika konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP berpengaruh terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*, maka pemberian biosurfaktan dengan konsentrasi yang berbeda akan memberikan perbedaan diameter penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*.

1.4.2 Hipotesis statistika

H_0 : Tidak ada pengaruh perbedaan konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*

H_1 : Ada pengaruh perbedaan konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*

1.5 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui kemampuan penghambatan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*.
2. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP yang berbeda terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*
3. Untuk mengetahui nilai MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*

1.6 Manfaat Penelitian

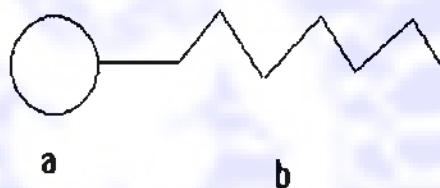
Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang potensi penghambatan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*. Sehingga biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dapat diaplikasikan sebagai alternatif pengganti pestisida.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Biosurfaktan

Biosurfaktan adalah molekul yang bersifat amfifatik, yang terdiri dari komponen hidrofilik dan hidrofobik (gambar 2.1) (Koch *et al.*, 1991). Gugus hidrofilik (polar) berupa karbohidrat, asam amino, peptida siklik, fosfat, asam karboksilat dan alkohol (Desai and Banat, 1997). Sedangkan gugus hidrofobik (non polar) umumnya berupa rantai hidrokarbon dari asam lemak (Koch *et al.*, 1991).



Gambar 2.1 Struktur Molekul Biosurfaktan (Cooper and Jazic, 1980)
a. Gugus hidrofilik, b. Gugus hidrofobik

Komposisi kimia biosurfaktan sangat bervariasi, dapat berupa asam lemak, fosfolipid, glikolipid, lipopeptida, lipoprotein, kompleks lemak-polisakarida dan kompleks protein-polisakarida. Jenis biosurfaktan tergantung pada strain, substrat dan kondisi pertumbuhan (Bertrand *et al.*, 1994).

2.2 Jenis dan Mikroba Penghasil Biosurfaktan

Mikroorganisme dapat memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat terlarut seperti karbohidrat, maupun substrat tidak larut seperti hidrokarbon, minyak, dan lilin (Carillo *et al.*, 1996). Selama tumbuh pada substrat yang spesifik, banyak mikroorganisme yang mensintesis bahan-bahan yang bersifat tensioaktif yang disebut biosurfaktan. Molekul biosurfaktan dapat bersifat ekstraseluler atau terdapat pada permukaan sel mikroorganisme.

Struktur molekul biosurfaktan yang disintesis setiap mikroba berbeda – beda. Semuanya berpotensi meningkatkan usaha perbaikan lingkungan dan digunakan untuk proses emulsifikasi. Jenis biosurfaktan yang di produksi tergantung pada strain mikroba, substrat tumbuh, dan kondisi pertumbuhan. Sifat fisika dan kimia, penurunan tegangan permukaan dan stabilitas emulsifikasi sangat penting dalam pemilihan biosurfaktan potensial (Desai and Banat, 1997).

Jenis – jenis biosurfaktan dan mikroba yang memproduksinya tertera dalam tabel 2.1. Kelompok biosurfaktan utama meliputi glikolipid, fosfolipid dan asam lemak, lipopeptida, surfaktan polimerik dan surfaktan partikulat (Desai and Banat, 1997).

Jenis glikolipid dan lipopeptida sering digunakan sebagai bahan aditif makanan dan kosmetik (Juwarkar *et al.*, 1994). Selain sebagai zat aditif makanan dan kosmetik, lipopeptida dari *Bacillus subtilis* yang disebut surfaktin juga digunakan sebagai antimikroba (Bais *et al.* 2004).

Tabel.2.1 Jenis Biosurfaktan dan Mikroorganisme Penghasil Biosurfaktan

| Jenis Biosurfaktan | Mikroorganisme |
|---|--|
| Glycolipid <ul style="list-style-type: none"> • Rhamnolipid • Trehalolipid • Sophorolipid | <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> |
| Lipopeptida dan lipoprotein <ul style="list-style-type: none"> • Peptida-lipid • Viscosin • Surfactin • Subtilisin • Gramicidin • Polymyxin | <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i> |
| Asam lemak dan phospholipid <ul style="list-style-type: none"> • Asam lemak • Phospholipid | <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> |
| Biosurfaktan Partikulat <ul style="list-style-type: none"> • Vasikula membran • Fimbriae • Seluruh bagian sel | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Berbagai jenis mikroba |

(Desai and Banat, 1997)

2.3 Aplikasi Biosurfaktan

2.3.1 Aplikasi biosurfaktan secara umum

Menurut Cooper dan Jazic (1980) biosurfaktan berfungsi : (1) membantu pengenceran dan dispersi pupuk dan pestisida, (2) sebagai detergen, (3) membantu emulsifikasi lemak atau hidrokarbon pada bahan pangan dan kosmetik, (4) biodegradasi limbah minyak.

Aplikasi biosurfaktan *Bacillus licheniformis* digunakan sebagai detergen, kosmetik, dan bahan aditif begitu juga dengan biosurfaktan dari strain *Pseudomonas aeruginosa* SB30 dapat membersihkan kontaminasi tumpahan minyak dari kapal Exxon Valdez (Juwarkar *et al.*,1994). Jepang telah memproduksi biosurfaktan untuk industri kosmetik antara lain : rhamnolipid, surfaktin, sophorolipid, dll (Juwarkar *et al.*,1994).

Biosurfaktan merupakan pengemulsi yang sangat baik, emulsi yang dihasilkan lebih stabil dibanding surfaktan sintesis, sehingga sangat penting untuk biodegradasi pada lingkungan yang tercemar (Bertrand *et al.*, 1994). Di lingkungan laut biosurfaktan diaplikasikan untuk pembersihan penampungan minyak dan pembersihan pantai-pantai yang terkontaminasi minyak (Desai and Banat, 1997).

Biosurfaktan juga dapat digunakan untuk biodegradasi racun logam berat seperti uranium, cadmium, dan timbal. Dalam bidang kesehatan dan kosmetik biosurfaktan dapat digunakan sebagai bahan pengemulsi, dan bahan campuran obat-obatan (Desai and Banat, 1997). Selain itu juga dapat digunakan dalam berbagai aktivitas seperti industri minyak, farmasi, agrikultural, industri, pembuatan deterjen, industri makanan, kertas, tekstil, dan industri logam (Juwarkar *et al.*,1994).

2.3.2 Aplikasi biosurfaktan di bidang pertanian

Biosurfaktan *Bacillus subtilis* jenis lipopeptida mempunyai aktivitas antimikroba melawan mikroorganisme fitopatogen (Kosaric, 1993; Bais *et al.*, 2004). Aktivitas antimikroba dari lipopeptida dapat menurunkan jumlah

mikroorganisme fitopatogen (Monteiro *et al.*, 2005). Colorado *university* telah berhasil mengisolasi *Bacillus subtilis* yang menghasilkan surfaktin sebagai bahan antimikroba fitopatogen *Pseudomonas syringae* (Bais *et al.*, 2004). Amerika telah membuat produk biosurfaktan paten Serenade yang di jual secara komersial untuk pengendali penyakit tanaman akibat mikroorganisme (Monteiro *et al.*, 2005).

2.4 Produksi Biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis*

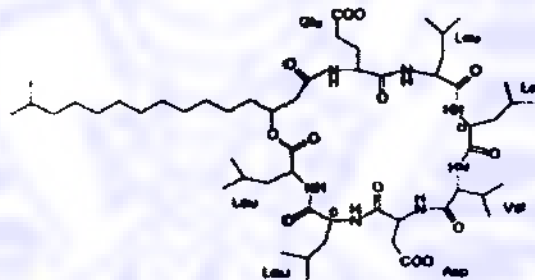
Biosurfaktan dapat dihasilkan dari proses pertumbuhan mikroorganisme secara aerobik dengan berbagai sumber karbon, misalnya karbohidrat, hidrokarbon, minyak dan lemak atau campuran antara keduanya (Jacobucci, 2001). Biosurfaktan juga bisa diproduksi dengan substrat yang tidak larut air misalnya hidrokarbon ataupun substrat larut air. Beberapa spesies dari *Bacillus* dan *Rhodotorula* efisien dalam menghasilkan biosurfaktan dengan substrat senyawa yang larut air (Makkar and Cameotra, 1997).

Bacillus subtilis mampu memproduksi biosurfaktan jenis lipopeptida sebagai produk ekstraseluler yang disebut surfaktin. Surfaktin merupakan biosurfaktan yang di isolasi dari kultur *Bacillus subtilis* dari substrat glukosa (Yuliani, 2004). Surfaktin mampu menurunkan tegangan permukaan media sebesar 40 dyne/cm sehingga diketahui kehandalan surfaktin tersebut dalam mengemulsi, dan indikasi adanya zat yang bersifat aktif permukaan dari produk tersebut (Makkar and Cameotra, 1997).

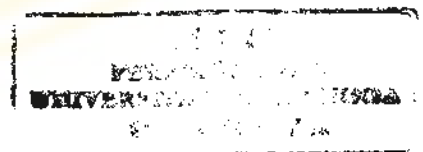
2.5 Karakterisasi Biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis*

Karakter fisik lipopeptida dipengaruhi pH dan temperatur. Temperatur pada kisaran 20 – 60°C tidak memperlihatkan perubahan nilai tegangan permukaan. Aktivitas lipopeptida berada pada kisaran pH 5 – 9 di bawah dan di atas nilai pH kisaran tersebut dapat menurunkan aktivitasnya (Jenny *et al.*, 1993 dalam Kosaric, 1993)

Biosurfaktan memiliki banyak kehandalan dikarenakan komponen lipopeptida dapat berfungsi sebagai senyawa aktif permukaan dan antibiotik (Hommel *et al.*, 1987). Lipopeptida siklik dari *Bacillus subtilis* (gambar 2.2) dikenal mempunyai efektifitas yang tinggi (Cooper and Jazic, 1980). Surfaktin mampu mereduksi tegangan permukaan air menjadi 27 mN/m dengan konsentrasi produk murni 20 mg/l (Kludge *et al.*, 1998)



Gambar 2.2 Struktur Lipopeptida Siklik Surfaktin *Bacillus subtilis* (Cooper and Jazic, 1980)



2.6 Tinjauan *Bacillus subtilis* 3KP

Bacillus subtilis 3KP yang berasal dari kali Donan Cilacap mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Phyllum : Firmicutes
Classis : Bacilli
Ordo : Bacillales
Familia : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus subtilis* 3KP
(Madigan *et al.*,2000)

Bacillus subtilis 3KP merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang dan membentuk rantai –rantai sel, memiliki endospora terminal, motil, bersifat aerob. Bersifat positif dalam uji katalase dan MR sedangkan bersifat negatif dalam uji oksidase, uji Indol, dan uji VP. Bakteri ini dapat menghidrolisis pati dan dapat membentuk asam dari rafinosa, rhamnosa, glukosa, dan xylosa yang ditunjukkan dengan perubahan warna gula – gula tersebut dari merah ke warna kuning. Pada uji TSIA nampak warna kuning pada permukaan miring agar dan kemerahan pada ujung tabung (Madigan *et al.*,2000) .

2.7 Tinjauan Mikroba Uji

2.7.1 Tinjauan *Xanthomonas campestris*

Xanthomonas campestris mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

| | |
|---------|--|
| Phylum | : Proteobacteria |
| Class | : Zymobacteria |
| Ordo | : Xanthomonadales |
| Family | : Xanthomonadaceae |
| Genus | : <i>Xanthomonas</i> |
| Species | : <i>Xanthomonas campestris</i> (Madigan <i>et al.</i> ,2000) |

Xanthomonas campestris tergolong bakteri yang bersel tunggal, berbentuk batang lurus, tidak membentuk spora, dan bersifat gram negatif. Bakteri berukuran 0,4 – 1 X 1,5 - 4 mikron, tidak punya kapsul, motil dengan flagel polar, hidup pada kondisi aerob dengan temperatur optimal 25-30°C. Koloni berwarna kuning, lembut, uji oksidasi negatif kadang-kadang positif, uji katalase positif. Merupakan patogen tanaman (Madigan *et al.*,2000; Abadi, 2003).

Xanthomonas campestris menyerang tanaman cabai, kubis, kedelai, padi dan buncis. *Xanthomonas campestris* dapat menyebabkan perubahan warna dan pengeritingan pada daun. Selain itu *Xanthomonas campestris* juga menginfeksi organ lain seperti batang dan akar. Apabila *Xanthomonas campestris* telah menginfeksi ke akar maka kemungkinan besar tanaman tersebut akan mengalami kematian (Anonim, 2000; Abadi, 2003).

2.7.2 Tinjauan *Fusarium solanii*

Fusarium solanii mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Division : Amastigomycota

Sub Division : Deutromycota

Class : Deutromycetes

Ordo : Hypomycetales

Family : Tuberculariaceae

Genus : *Fusarium*

Spesies : *Fusarium solanii*
(Landecker, 1996)

Koloni tumbuh baik pada media PDA dengan suhu 25°C, koloni seperti kapas, kemudian menjadi seperti bludru berwarna putih kemudian keunguan. Mikrokonidia tidak bersepta hingga bersepta dua, klamidospora terdapat dalam hifa atau dalam konidia, berdinding halus, berbintik semi bulat, makrokonidia berbintik agak membengkok. Spesies ini patogen pada tumbuhan atau tanaman biji serelia, kentang, apel dan lain-lain (Gandjar *et al.*, 1999)

Fusarium solanii menyerang beberapa tanaman Solanaceae antara lain : cabai, tomat, dll. *Fusarium solanii* dapat menyebabkan layunya jaringan pembuluh tanaman, membusukkan batang dan menginfeksi biji. Apabila kapang sudah menginfeksi bagian akar sehingga akarnya membusuk mengakibatkan kematian pada tanaman (Anonim, 2000; Abadi, 2003).

2.8 Tinjauan Antimikroba

Antimikroba adalah bahan kimia alami atau sintetik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Antimikroba tidak hanya menyebabkan tidak aktifnya suatu enzim tetapi juga dapat menyebabkan kerusakan sel, misalnya lisis yang disebabkan oleh *surface active agent*. Senyawa antimikroba dapat juga menyebabkan pembekuan (aglutinasi) protein sehingga mikroba tidak mungkin lagi berkembangbiak. Sedangkan aktivitas mikroba yang dapat diamati secara langsung adalah perkembangbiakannya (Madigan *et al.*, 2000).

Mekanisme daya kerja antimikroba terhadap sel antara lain merusak dinding sel, mengganggu permeabilitas sel, merusak molekul protein dan asam nukleat. Kecepatan dan efisiensi kerusakan mikroba oleh senyawa antimikroba dipengaruhi oleh suhu, pH, waktu, konsentrasi dan adanya komponen organik lainnya. Penggunaan suatu senyawa antimikroba secara tepat harus mempertimbangkan pengaruh kondisi lingkungan tersebut (Muslimin, 1995).

Potensi penghambatan senyawa antimikroba dapat diuji dengan penentuan nilai MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) yaitu konsentrasi terendah yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan mikroba dan MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) atau MFC (*Minimal Fungicidal Concentration*) yang merupakan konsentrasi terendah yang digunakan untuk membunuh mikroba (Salle, 1967).

2.9 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Mikroorganisme (Antimikroba)

Menurut Pelczar and Chan (1988), Muslimin (1995) dan Wistreich (2003), banyak faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba. Faktor-faktor tersebut antara lain :

a. Konsentrasi atau intensitas zat antimikroba

Makin tinggi konsentrasi zat antimikroba maka sel-sel mikroba akan terbunuh lebih cepat.

b. Jumlah mikroorganisme

Semakin banyak jumlah mikroorganisme, maka perlakuan harus diberikan lebih lama agar bisa dipastikan bahwa semua sel tersebut mati.

c. Suhu

Kenaikan suhu dapat menaikkan keefektifan suatu bahan antimikroba lain. Hal ini akibat adanya zat kimia yang merusak mikroorganisme melalui reaksi-reaksi kimia dan laju reaksi kimiawi yang dipercepat dengan meningkatkan suhu.

d. Jenis mikroorganisme

Senyawa antimikroba tidak mempunyai aktivitas yang sama terhadap bakteri, fungi, virus dan mikroba lainnya. Spora lebih tahan daripada sel vegetatif. Begitu juga dengan ketahanan bakteri Gram-positif terhadap senyawa antimikroba berbeda dengan Gram-negatif. Perbedaan ketahanan terhadap senyawa antimikroba juga terjadi antara galur-galur dalam spesies yang sama. Oleh karena itu, penggunaan suatu senyawa antimikroba harus dipilih berdasarkan organisme yang akan dibunuh.

e. Adanya bahan organik

Adanya bahan organik asing dapat menurunkan keefektifan zat kimia antimikroba dengan cara menginaktifkan zat antimikroba tersebut.

f. pH

Mikroorganisme yang hidup pada pH asam dapat dibasmi pada suhu yang lebih rendah dan dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan mikroorganisme yang sama di dalam lingkungan basa.

2.10 Potensial Penghambatan Surfaktan terhadap Mikroba

Biosurfaktan diketahui memiliki aktivitas antimikroba menggantikan surfaktan sintetik. Pada umumnya surfaktan lebih mudah menyerang bakteri gram positif daripada bakteri gram negatif karena perbedaan struktur dinding selnya. Protein dan lipopolisakarida yang menyusun dinding sel bakteri gram negatif mampu melindungi membran sel bakteri dari serangan surfaktan (Lang and Wagner., 1996).

Bacillus licheniformis dapat menghasilkan biosurfaktan jenis lipopeptida lichenysin A, yang mempunyai kemampuan hampir sama dengan *Bacillus subtilis*. Lipopeptida dari *Bacillus licheniformis* mempunyai aktifitas biologi / antimikroba dalam melawan yeast, bakteri dan fungi / kapang (tabel 2.2). (Yakimov *et al.*, 1995).

Tabel 2.2 Aktivitas Antimikroba Permukaan Aktif Lipopeptida dari *Bacillus licheniformis* Melawan Yeast, Bakteri dan Kapang pada Agar Difusi dan Dilusi

| Mikroorganisme | Media test | Temperatur (°C) | MIC ^a (mg mL ⁻¹) | MIC ^b (mg mL ⁻¹) | Zona ^c penghambatan |
|---------------------------------|------------|-----------------|---|---|--------------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i> | LB | 37 | 0,5 | - | ++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | LB | 30 | 1 | - | +++ |
| <i>Escherichia coli</i> | LB | 37 | 1 | 0,5 | ++++ |
| <i>Candida utilis</i> | YEPD | 30 | 1 | 0,1 | +++ |
| <i>Candida tropicalis</i> | YEPD | 30 | 1 | 0,1 | +++ |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> | YEPD | 30 | 10 | - | + |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | YEPD | 30 | 5 | 0,1 | ++ |
| <i>Trichoderma reesei</i> | MEA | 30 | 0,5 | 0,1 | ++ |
| <i>Penicillium oxalicum</i> | MEA/PDA | 30 | 0,1 | - | ++++ |

(Jenny *et al.*, 1991)

^a MIC, *Minimal Inhibitor Concentration* lipopeptida terhadap mikroorganisme selama fase eksponensial

^b MIC, *Minimal Inhibitor Concentration* lipopeptida terhadap mikroorganisme selama fase penurunan dan kematian

^c Maksimum diameter halos : + = 7 – 10 mm, ++ = 11 – 14 mm, +++ = 15 – 18 mm, ++++ = > 18mm

Dari genus *Bacillus* mempunyai 2 jenis struktur lipopeptida yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus subtilis*. Keduanya mempunyai antimikroba sifat yang sama misalnya pada kelompok antibiotik peptida dari lipopeptida (iturin, mycosubtilin, bacilomycin) dari *Bacillus licheniformis* menunjukkan kesamaan struktur dengan kelompok lactone (esperin, surfactin, polipeptin) dari *Bacillus subtilis*. Perbedaan keduanya hanya terdapat pada struktur C terminal asam amino (leucine diganti dengan isoleucine) dengan

komposisi dari lipofilik pada surfaktin. Dari genus diatas dapat dibandingkan aktivitas antimikroba yang ada pada lipopeptida yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus subtilis*.

Tabel 2.3 Potensi Penghambatan Surfaktin dan Lichenisin A terhadap Mikroba

| Mikroorganisme | Diameter halo | | |
|---------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | Surfaktin | Lichenycin | |
| | | Produk kasar | Produk murni |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | +++ | ++ | + |
| <i>Alcaligenes eutrophus</i> | +++ | ++ | + |
| <i>Bacillus cereus</i> | +++ | - | - |
| <i>Bacillus licheniformis</i> BASS0 | ++++ | - | - |
| <i>Bacillus sp. Strain ATCC 39307</i> | ++ | + | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ++ | ++ | + |
| <i>Escherichia coli</i> | +++ | ++ | ++ |
| <i>Enterobacter sp strain 306</i> | ++ | + | + |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> | ++++ | ++ | ++ |
| <i>Pseudomonas proteofaciens</i> | ++ | + | ++ |
| <i>Rhodococcus globerulus</i> | ++++ | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ++++ | + | + |

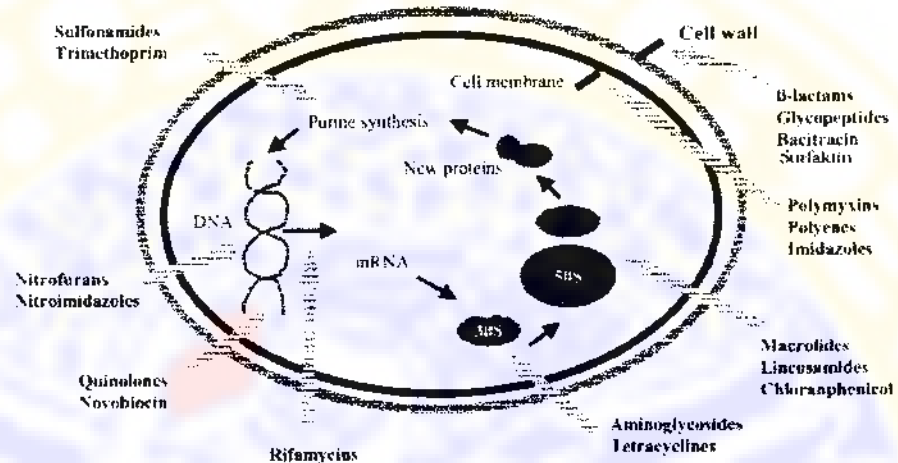
(Yakimov *et al.*, 1995)

-, < 5 mm; +, 6 – 7 mm; ++, 8 – 9 mm; +++, 10 – 11mm; +++++, > 11mm.

Aktivitas antimikroba dari surfaktin telah diuji melawan berbagai fitopatogen diantaranya *Fusarium solanii* dan *Xanthomonas campestris* (Lang and Wagner., 1996; Bais *et al.*, 2004). Nilai MIC dari masing – masing mikroba berbeda yaitu 75 µg/mL untuk *Fusarium solanii*. dan 25 µg/mL untuk *Xanthomonas campestris* (Lang and Wagner., 1996; Bais *et al.*, 2004).

Surfaktin merupakan senyawa metabolit sekunder dari *Bacillus subtilis*. Mekanisme aktivitas penghambatan dari senyawa metabolit sekunder mikroorganisme berbeda – beda tergantung jenis senyawanya (Madigan *et al.*,

2000). Beberapa contoh mekanisme penghambatan senyawa metabolit sekunder termasuk surfaktin (gambar 2.3).



Gambar 2.3 Mekanisme Penghambatan Berbagai Senyawa Metabolit Sekunder Mikroorganisme (Stein, 2005)

2.10 Penentuan Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Mikroorganisme (Antimikroba)

Menurut Bailey dan Scott (1994) untuk mengetahui efek antimikroba secara *invitro* dapat dilakukan beberapa cara, yaitu:

1. Metode penyebaran (*diffusion method*)
 1. Metode cakram kertas (*disc diffusion method*)
 2. Metode cangkir agar (*agar cup method*)
 3. Metode cairan dalam cincin (*ring plate method*)

2. Metode pengenceran (*Dilution method*)
 1. Metode pengenceran dalam agar (*agar dilution method*)
 2. Metode pengenceran dalam tabung (*tube dilution method*)

Metode yang sering digunakan untuk penentuan efek antimikroba adalah metode cakram kertas, dan metode cangkir agar (Salle, 1961). Metode cakram kertas sering digunakan di beberapa laboratorium mikrobiologi karena metode tersebut mudah dan tidak mahal (Bailey and Scott, 1994).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan April sampai bulan Agustus 2005 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

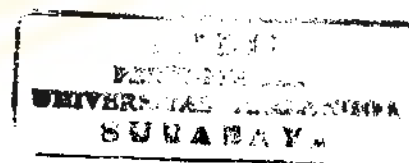
3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan - bahan yang digunakan dalam metode penelitian ini adalah :

Bakteri penghasil biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP yang diisolasi dari Kali Donan Cilacap, mikroba uji *Xanthomonas campestris* merupakan koleksi laboratorium mikrobiologi FMIPA UNAIR dan *Fusarium solanii* merupakan koleksi laboratorium mikologi FMIPA Institut Pertanian Bogor (IPB).

Nutrien Agar (NA), *Nutrien Broth* (NB), *Mueller -- Hinton broth* dan *Mueller -- Hinton agar*, *Potato Dextrose broth* dan *Potato Dextrose Agar*, NaCl, NaNO₃, MgSO₄.7H₂O, KCl, FeSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, MnSO₄.H₂O, NaMoO₄.2H₂O, CoCl₂.6H₂O, K₂HPO₄, H₂PO₄, BaSO₄, CaCl₂, NaOH, HCl, H₃BO₃, [NH₄]₂SO₄ dan molase.



3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam metode penelitian ini adalah :

Botol kultur 100 ml, gelas ukur 50 ml, cawan petri, labu Erlenmeyer 100 ml, 500 ml dan 1000 ml, mikroskop cahaya, penggaris, spektrofotometer (Baush-Lomb, spectronik 20), neraca analitik (shimadzu, AEL-200), magnetik stirer (SBS, M6-78-1), tensiometer Du-Nouy, penangas air, vortec, shaker inkubator, sentrifuse, pengaduk kaca, tabung reaksi, pipet (5 ml & 10 ml), pembakar bunsen, jarum ose, mikropipet, gelas beker dan autoklaf (Ogawa Seiki), cakram kertas steril dan jangka sorong.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan rancangan penelitian merupakan rancangan acak lengkap, 16 perlakuan dengan 4 kali ulangan.

3.3.2 Variabel penelitian

Variabel penelitian ini ada tiga yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kendali .

- (1) Variabel bebas : Konsentrasi biosurfaktan (ppm) dan jenis mikroba uji.
- (2) Variabel terikat : Diameter daerah penghambatan (mm), nilai MIC
- (3) Variabel kendali : pH, volume agar, jumlah awal mikroba uji

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan media air mineral sintetis (AMS)

Air mineral sintetis yang digunakan adalah air mineral sintetis komposisi dari Guerra santos (1984) yang merupakan media dasar pertumbuhan bakteri. Media ini didapat dengan melarutkan NaCl (10,000 g/l), NaNO₃ (2,7500 g/l), CaCl₂ 2H₂O (0,05 g/l), MgSO₄ 7H₂O (0,4004 g/l), dan KCl (1, 001 g.l) kedalam akuades sebagai makroelemen. Kemudian ditambahkan mikroelemen yang tersusun atas FeSO₄ 7H₂O (0,0005 g/l), ZnSO₄ 7H₂O (0,0015 g/l), Na₂MoO₄ 2H₂O (0,001 g/l), MnSO₄ H₂O (0,00150 g/l), CuSO₄ 5H₂O (0,00015 g/l), CoCl₂ 6H₂O (0,00015 g/l), H₃BO₃ (0,00033 g/l). Larutan dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stirrer. Untuk unsur fosfat digunakan secara terpisah yaitu K₂HPO₄ (2,002 g/l) dan KH₂PO₄ (1,0010 g/l) dilarutkan dalam akuades dan disterilkan secara terpisah

3.4.2 Pembuatan stok bakteri *Bacillus subtilis* 3KP

Biakan murni bakteri *Bacillus subtilis* 3KP yang akan diuji diperbanyak dalam tabung reaksi pada media agar miring dengan melarutkan *Nutrient Agar* (20 g/l) dan NaCl (10 g/l) ke dalam akuades. Bakteri ditanam dalam metode gores, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 27 °C. Koloni yang tumbuh dengan baik digunakan sebagai stok bakteri selama penelitian ini.

3.4.3 Perbanyak bakteri dalam *Nutrient Broth*

Mengambil beberapa ose bakteri uji dari tabung reaksi (agar miring) ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml yang berisi 10 ml NB yang dibuat dengan cara melarutkan NB (8 g/l) dan NaCl (10 g/l) dalam akuades. Kultur bakteri dalam

Nutrient Broth diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C , selanjutnya kultur ditanam ke media prekultur bakteri.

3.4.4 Pembuatan prekultur bakteri

Ke dalam labu Erlenmeyer berukuran 100 ml yang berisi 30 ml *nutrient broth* di tambahkan 2 ml kultur bakteri dari media *nutrient broth*. Prekultur bakteri diinkubasi selama 18 jam.

3.4.5 Pembuatan kultur bakteri

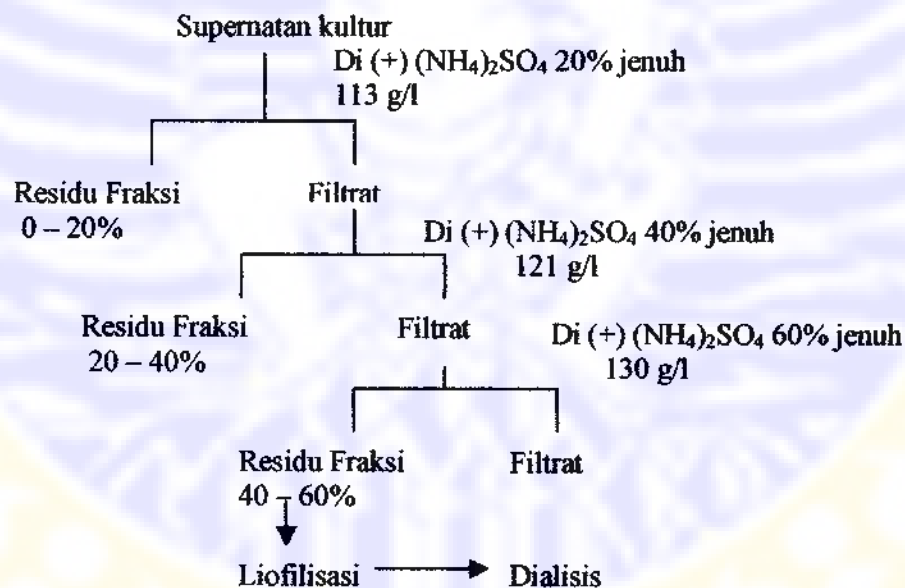
Dua buah labu Erlenmeyer berukuran 2000 ml masing – masing diisi dengan 500 ml air mineral sintesis dan 10 gram substrat molase. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dan bila larutan terlalu basa harga pH-nya diatur dengan cara menambahkan HCl dan bila terlalu asam ditambahkan larutan NaOH, sehingga diperoleh larutan dengan pH 7. Media disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit.

Kedalam masing – masing labu Erlenmeyer ditambahkan 16,67 ml larutan fosfat dan 25 ml kultur bakteri dari media prekultur bakteri yang memiliki nilai $\text{OD} = 0,5$ pada λ_{610} . prekultur bakteri dengan nilai $\text{OD} > 0,5$ diencerkan dengan air fisiologis hingga mencapai $\text{OD} = 0,5$. Kultur bakteri diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 27°C , 90 rpm dan waktu inkubasi selama 7- 14 hari.

3.4.6 Isolasi dan pemisahan biosurfaktan dengan fraksinasi amonium sulfat

Sel bakteri dipisahkan dari medium yang mengandung surfaktan dengan sentrifugasi (4400 rpm, 20 menit, 27°C). Ekstraksi biosurfaktan dari supernatan kultur dengan cara pengendapan menggunakan amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kadar tinggi (*salting out*) secara fraksinasi bertingkat untuk mengurangi aktivitas air

sehingga senyawa aktif permukaan yang semula larut dalam air akan terendapkan. Fraksinasi dilakukan dengan amonium sulfat 20%, 40%, 60% jenuh. Supernatan kultur dengan volume 200 ml dimasukkan dalam Erlenmeyer dan direndam dengan penangas es. Kemudian amonium sulfat dimasukkan secara perlahan sambil diaduk dengan pengaduk magnet, sampai kadar amonium sulfat mencapai 20% jenuh (113 g/l). Pengadukan dalam keadaan terendam es diteruskan selama 15 menit kemudian dilakukan sentrifugasi, residu dipisahkan dan disimpan dalam keadaan beku. Sedangkan supernatan ditambah sejumlah amonium sulfat sampai mencapai 40% (121 g/l) jenuh dalam keadaan terendam es sambil diaduk. Kemudian pengadukan diteruskan selama 15 menit dan disentrifugasi, diperoleh residu (disimpan beku) dan supernatan. Perlakuan tersebut diulang untuk kadar 60% (130 g/l) jenuh (gambar 3.1).



Gambar 3.1 Fraksinasi Supernatan Kultur dengan Amonium Sulfat

Selama ekstraksi didapatkan fase endapan dan filtrat kemudian kedua fase tersebut dipisahkan. Fase endapan yang diperoleh diliofilisasi. Serbuk hasil liofilisasi dari fase tersebut merupakan produk kasar biosurfaktan. Produk tersebut kemudian ditimbang dengan neraca analitik Shimadzu AEL – 200 dan didialisis untuk menghilangkan amonium sulfat.

3.4.7 Dialisis

larutan biosurfaktan dimasukkan kedalam tabung selofan yang telah dicuci (lampiran 1) dan salah satu ujungnya disimpul. Setelah setengah dari volume tabung terisi larutan biosurfaktan, maka ujung yang lain diikat.

Tabung selofan yang berisi larutan biosurfaktan dimasukkan kedalam gelas ukur 1000 ml yang berisi 1000 ml Buffer Tris HCl, sambil terus diaduk dengan magnetic stirrer. Dialisis dilakukan selama 24 jam, setiap 3 jam dilakukan penggantian Buffer Tris HCl, sampai dideteksi tidak ada kandungan amonium sulfat. Tidak terdapatnya amonium sulfat ditandai dengan penambahan BaNO_3 pada Buffer Tris HCl maka tidak terdapat endapan putih.

Setelah proses dialisis selesai, larutan biosurfaktan dikeluarkan dari tabung selofan dan volumenya diukur, kemudian diliofilisasi.

3.4.8 Uji Aktivitas Biosurfaktan

Uji aktivitas biosurfaktan meliputi pengukuran tegangan permukaan, aktivitas emulsi dan stabilitas emulsi. Tegangan permukaan dari biosurfaktan diukur dengan metode cincin menggunakan CSC – Du Nouy Tensiometer pada suhu kamar. Sedangkan aktivitas emulsi diukur dengan metode visual. Sampel dilarutkan dalam akuades sampai volume 2 ml dan 3 ml minyak uji. Campuran

dihomogenkan dengan vortex selama 2 menit dan diamati persentase emulsinya setiap 10 menit dari jam ke 0 sampai jam ke 1 (Yuliani, 2004).

3.4.9 Pembuatan larutan biosurfaktan

Hasil liofilisasi di timbang dengan timbangan analitik kemudian diambil 0,1 gram, dilarutkan dalam 10 ml akuades (10.000 ppm). Dari konsentrasi tersebut diencerkan dengan akuades menjadi 7000 ppm, 4000 ppm, 1000 ppm, 700 ppm, 400 ppm, 100 ppm dan kontrol (0 ppm)

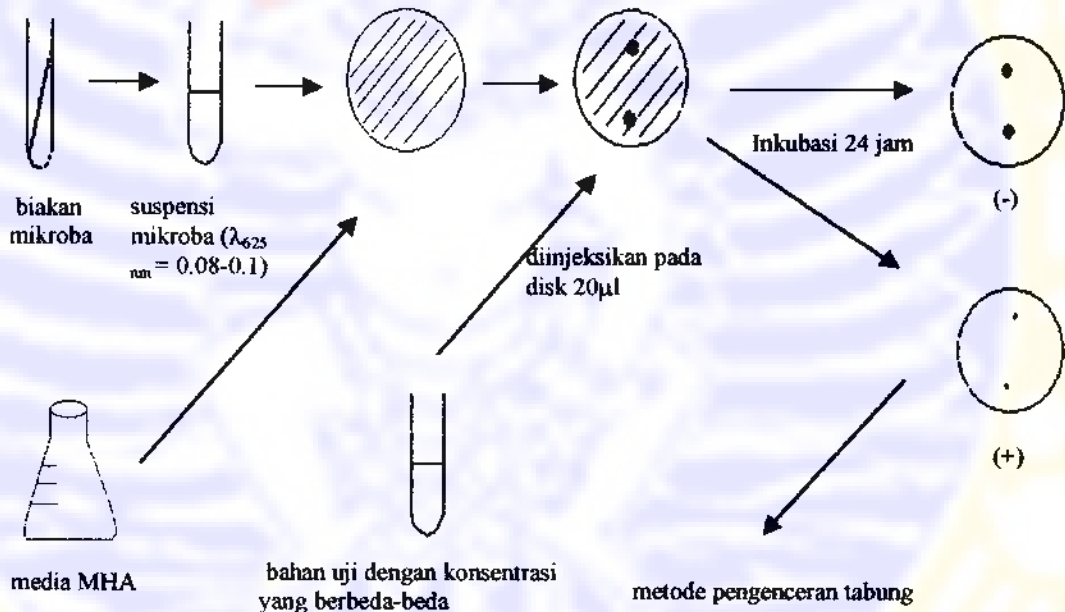
3.4.10 Penentuan aktivitas antimikroba

Dalam penelitian ini, untuk mengetahui aktivitas antimikroba biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP digunakan metode cakram kertas dan metode pengenceran dalam tabung .

3.4.10.1 Metode cakram kertas (*disc diffusion method*)

Metode cakram kertas dilakukan dengan menyiapkan media *Mueller-Hinton* agar steril sebagai media uji penghambatan. Suspensi Bakteri uji dibuat dengan OD 0,1 pada λ_{625} , sedangkan suspensi spora kapang dibuat dengan OD 0,08 pada λ_{530} sesuai dengan standard 0,5 Mc Farland. 1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan kedalam cawan petri kemudian dituangkan media agar kedalam cawan tersebut dengan ukuran (20 ml) dan ketebalan yang sama, setelah itu dihomogenkan. Agar dibiarkan memadat dan dingin. 4 cakram kertas steril dengan diameter 6 mm dan tebal yang sama diletakkan dipermukaan agar dengan jarak antar kertas berseberangan atau berjauhan. Cakram kertas tersebut diinjeksi larutan biosurfaktan yang telah dilarutkan dalam akuades dengan konsentrasi 10.000 ppm, 7.000 ppm, 4.000 ppm, 1.000 ppm, 700 ppm, 400 ppm, 100 ppm, 0

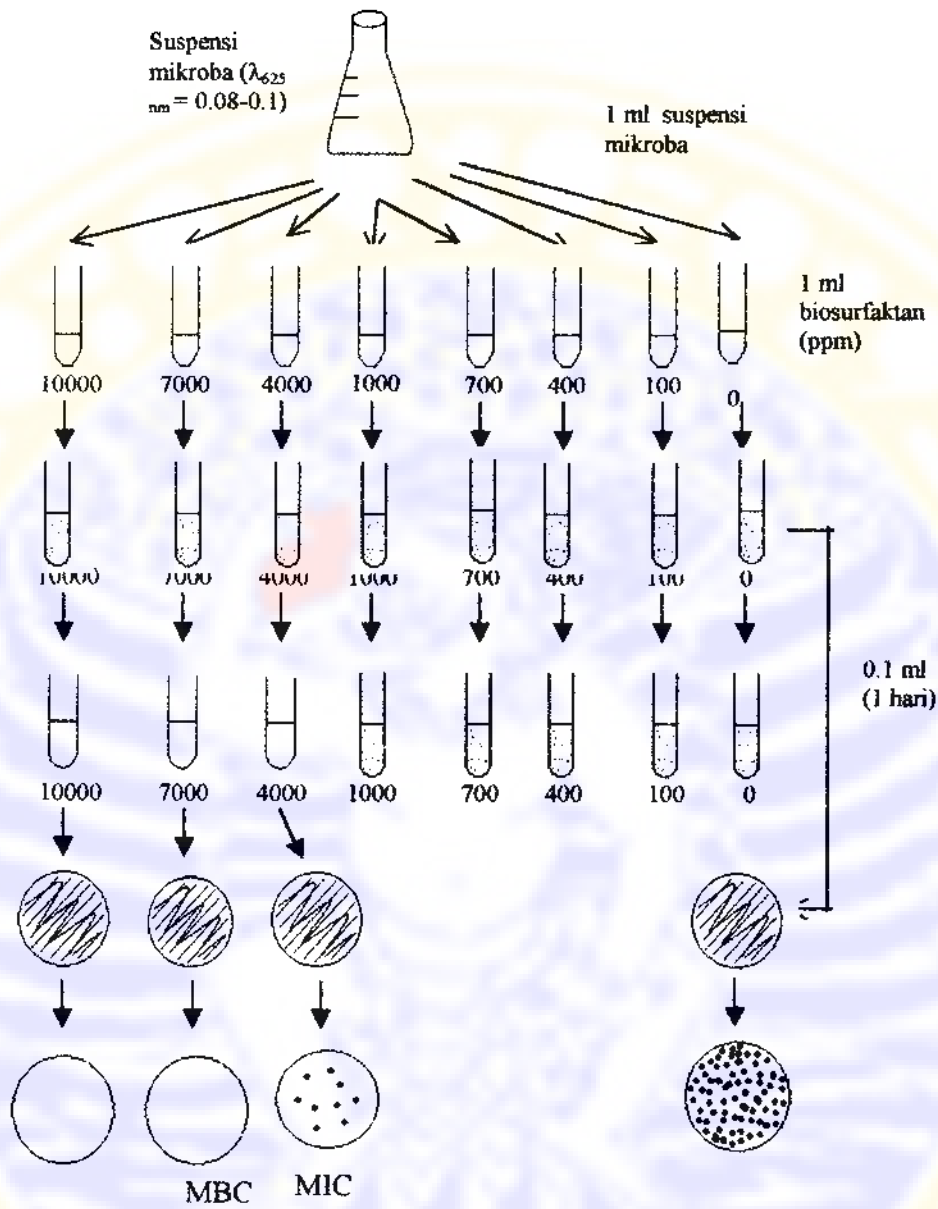
ppm. Volume biosurfaktan yang diinjeksikan sebanyak 20 μ l. Mikroba uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Penghambatan pertumbuhan ditunjukkan dengan terbentuknya daerah penghambatan (*halo*) jernih disekitar cakram kertas (Jenny *et al.*, 1993; Bailey and Scott, 1994). Jika terdapat penghambatan pertumbuhan, maka diameter daerah penghambatan tersebut diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pada konsentrasi yang menunjukkan hasil positif, dilakukan uji lanjutan dengan metode pengenceran untuk menentukan nilai MIC dan MBC/ MFC.



Gambar 3.2 Uji Penghambatan dengan Metode Cakram Kertas

3.4.10.2 Metode pengenceran dalam tabung (*tube dilution method*)

Metode pengenceran dilakukan dengan membuat suspensi mikroba uji pada media cair *Mueller-Hinton* sehingga diperoleh OD 0,1 pada λ_{625} . Untuk pengujian daya hambat pada kapang, suspensi spora diambil dengan cara menambahkan akuades steril kedalam biakan miring kemudian divortek pelan hingga suspensi terlihat keruh, kemudian suspensi diukur sampai OD 0,08 pada λ_{530} sesuai dengan standard 0,5 Mc Farland (10^6 CFU/ml). 1 ml suspensi mikroba uji dan biosurfaktan dengan konsentrasi (10000, 7000, 4000, 1000, 700, 400 dan 100) ppm dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kultur tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam. Suspensi mikroba uji tanpa penambahan biosurfaktan digunakan sebagai kontrol. Apabila terdapat aktifitas antimikroba maka tidak ada kekeruhan dalam kultur tersebut (merupakan nilai MIC), kemudian 0,1 ml kultur yang positif ditumbuhkan pada media agar dan diinkubasi selama 1 hari. Apabila mikroba tidak tumbuh pada media agar tersebut, maka pada konsentrasi tersebut merupakan nilai MBC/MFC biosurfaktan tersebut (Bailey and Scott, 1994).



Gambar 3.3 Uji Penghambatan dengan Metode Dilusi

3.11 Analisis Data

Data diameter penghambatan yang didapat dianalisis dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah dengan derajat signifikansi 0.05. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Different*) untuk mengetahui beda nyata terkecil antar perlakuan (Nazir, 1999). Sedangkan data nilai log TPC (*Total Plate Count*) di analisis untuk mempertegas nilai MIC.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP

Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dihasilkan dari kultur pertumbuhan *Bacillus subtilis* 3KP dengan menggunakan substrat molase sebagai sumber karbonnya selama 10 hari (Yuliani, 2004). Hasil liofilisasi supernatan kultur didapatkan serbuk kering produk kasar biosurfaktan berwarna coklat tua dengan berat kering sebesar 11,5629 gr/lt . Produk kasar tersebut didialisis untuk menghilangkan amonium sulfat yang ada didalamnya. Hasil liofilisasi produk biosurfaktan setelah didialisis sebesar 0,663 gr/lt (lampiran 9).

Karakteristik biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP diketahui dengan adanya penurunan nilai tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi terhadap minyak uji (kerosin dan solar). Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP nampak lebih baik secara visual dalam mengemulsifikasi solar (Yuliani, 2004). Produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas emulsifikasi (lampiran 3) dengan kestabilan emulsi sebesar 14% selama 48 jam (lampiran 3). Larutan produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dalam akuades mampu menurunkan nilai tegangan permukaan sebesar 36,96 mN/m dari nilai tegangan permukaan akuades 71,96 mN/m. Menurut Carillo et al (1996) penurunan tegangan permukaan supernatan kultur sebesar 10 mN/m menunjukkan adanya senyawa potensial yang bersifat aktif permukaan.

4.2 Uji Penghambatan Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP

4.2.1 Metode cakram kertas (*disc diffusion method*)

Uji penghambatan produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP pada dua jenis mikroba (*Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*) dilakukan dengan melakukan uji pendahuluan dengan menggunakan metode cakram kertas (*disc diffusion method*). Cakram kertas diinjeksi dengan Supernatan yang telah didialisis diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (lampiran 10). Dari hasil uji dengan menggunakan metode cakram kertas menunjukkan hasil positif yaitu terdapat aktivitas penghambatan pada kedua mikroba uji. Adanya aktivitas penghambatan produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP ditunjukkan dengan terbentuknya daerah penghambatan di sekitar cakram kertas (*paper disc*) yang telah diinjeksi larutan biosurfaktan dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu ruang.

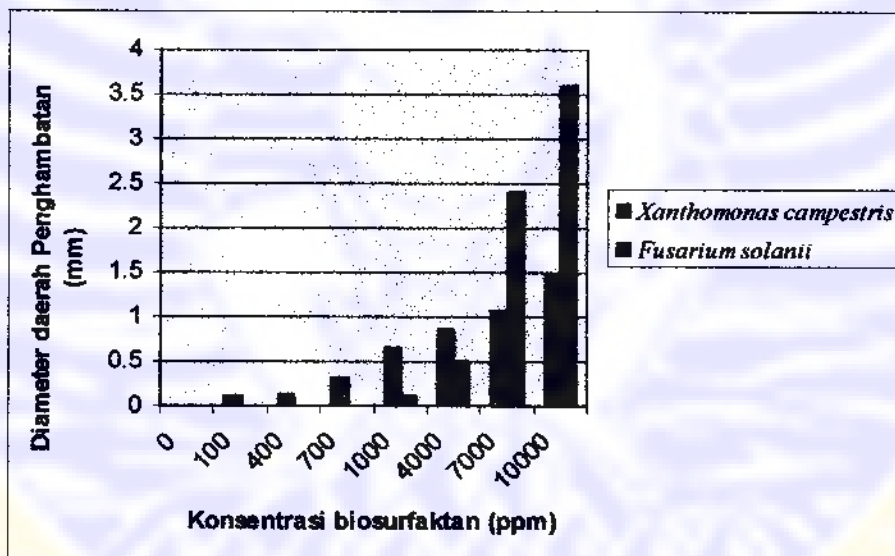
Dengan metode cakram kertas, nilai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) juga dapat diketahui dimana pada konsentrasi tertentu suatu agen antimikroba mulai menghambat pertumbuhan mikroba uji dengan jelas (secara visual) dan berbeda signifikan dengan kontrol. Seri pengenceran larutan biosurfaktan yang diujikan adalah konsentrasi 10.000, 7.000, 4.000, 1.000, 700, 400 dan 100 ppm. Hasil uji larutan biosurfaktan dengan metode cakram kertas pada kedua mikroba uji dapat dilihat pada gambar lampiran 11 dan 12, pada tabel 4.1, dan gambar 4.1 berikut :

Tabel 4.1 Diameter Daerah Penghambatan Pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP

| Mikroba | Ulangan | Diameter daerah penghambatan (± 0.025 mm)* | | | | | | | |
|----------------------|-----------|---|-----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|-------|
| | | 10.000 ppm | 7.000 ppm | 4.000 ppm | 1.000 ppm | 700 ppm | 400 ppm | 100 ppm | 0 ppm |
| <i>X. campestris</i> | 1 | 1.5 | 1.29 | 1.22 | 0.29 | 0.27 | 0.12 | 0.08 | 0 |
| | 2 | 1.54 | 1.66 | 0.22 | 1 | 0.5 | 0.16 | 0.09 | 0 |
| | 3 | 1.46 | 0.66 | 1.19 | 1.13 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0 |
| | 4 | 1.3 | 0.65 | 0.78 | 0.16 | 0.21 | 0.1 | 0.11 | 0 |
| | \bar{x} | 1.45 | 1.065 | 0.8525 | 0.645 | 0.3075 | 0.12 | 0.095 | 0 |
| | SD | 0.105 | 0.496 | 0.467 | 0.490 | 0.130 | 0.028 | 0.012 | 0 |
| <i>F. solanii</i> | 1 | 3.49 | 2.75 | 0.48 | 0.08 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 3.59 | 2.66 | 0.54 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 3.62 | 2.35 | 0.5 | 0.09 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 3.65 | 1.85 | 0.48 | 0.11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | \bar{x} | 3.5875 | 2.4025 | 0.5 | 0.095 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | SD | 0.0692 | 0.406 | 0.0288 | 0.0129 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Keterangan:

* : nilai ketelitian alat ukur (jangka sorong)



Gambar 4.1 Diagram Batang Diameter Daerah Penghambatan Pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP

Dari diagram tersebut di atas terlihat bahwa konsentrasi produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP mempengaruhi diameter daerah penghambatan pertumbuhan mikroba uji di sekitar cakram kertas uji. Semakin tinggi konsentrasi biosurfaktan, semakin besar pula diameter daerah penghambatannya terhadap mikroba uji. Rata-rata diameter daerah penghambatan terbesar adalah (3.5875 ± 0.069) mm pada *Fusarium solanii*, sedangkan rata-rata diameter daerah penghambatan terkecil terjadi pada *Fusarium solanii* sebesar (0.095 ± 0.012) mm dan *Xanthomonas campestris* sebesar (0.095 ± 0.0129) mm.

Produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP mulai menimbulkan penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dengan cukup jelas (kejernihan halo) dan berbeda signifikan dengan kontrol pada konsentrasi 1000 ppm dengan rata-rata diameter daerah penghambatan sebesar (0.645 ± 0.490) mm. Pada *Fusarium solanii*, biosurfaktan mampu menghambat pertumbuhannya secara signifikan pada konsentrasi 4.000 ppm dengan rata-rata diameter daerah penghambatan sebesar $(0,5 \pm 0.028)$ mm.

Selain konsentrasi biosurfaktan, perbedaan jenis mikroba uji juga mempengaruhi aktivitas biosurfaktan dalam menghambat masing-masing mikroba. Aktivitas penghambatan biosurfaktan berbeda terhadap bakteri (*Xanthomonas campestris*) dan kapang (*Fusarium solanii*). Sesuai dengan pernyataan Pelczar and Chan (1988) bahwa senyawa antimikroba tidak mempunyai aktivitas yang sama terhadap bakteri, kapang, virus dan mikroba lainnya.

Biosurfaktan *Bacillus subtilis* yang merupakan komponen aktif permukaan lipopeptida mampu menghambat pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*. *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan agen fitopatogen yang menyebabkan kerugian besar di bidang pertanian (Duriat, 2003). Selain itu *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* merupakan mikroba yang paling sering menyerang tanaman di daerah tropis (Monteiro *et al.*, 2005). *Xanthomonas campestris* merupakan bakteri gram negatif dimana susunan dinding selnya lebih tebal dibanding dengan bakteri gram positif (Madigan *et al.*, 2003). Dinding sel bakteri gram positif terdiri atas peptidoglikan dan asam teikoat sedangkan bakteri gram negatif terdiri atas tiga polimer yang tersusun dilapisan luar peptidoglikan yaitu lipoprotein, fosfolipid dan lipopolisakarida (Stein, 2005). Komponen dinding sel yang lebih tebal tersebut menyebabkan penghambatan biosurfaktan yang lebih sulit. *Fusarium solanii* merupakan kapang yang mempunyai konidiospora sebagai sel reproduksi aseksual. Dinding sel dari kapang terdiri atas komponen karbohidrat, selulosa dan chitin (Gandjar, *et al.*, 1999). Mekanisme penghambatan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dengan cara merusak dinding sel (Stein, 2005). Sedangkan pada *Fusarium solanii* dengan cara merusak permeabilitas (impermeabel) dari konidiospora sehingga dapat menghambat germinasi (Peng and Mustafa, 2001).

Hasil pengamatan daerah penghambatan secara visual tersebut diperkuat dengan uji statistik dengan menggunakan analisis varian. Dari hasil analisis varian (ANOVA) satu arah dengan derajat signifikansi 0,05 (pada lampiran 5 dan

lampiran 6) menunjukkan bahwa nilai signifikansi tes pada *Xanthomonas campestris* sebesar 0.000 dan *Fusarium solanii* sebesar 0.000. Kedua nilai signifikansi tersebut kurang dari derajat signifikansi, maka keputusannya H_0 ditolak, dengan kesimpulan terdapat perbedaan antara konsentrasi biosurfaktan dengan diameter daerah penghambatan pertumbuhan kedua mikroba uji. Dari hasil uji LSD (*Least Significance Difference*) secara umum menunjukkan bahwa perbedaan tersebut signifikan baik antara masing-masing konsentrasi maupun antara satu konsentrasi dengan masing-masing mikroba uji. Produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP menunjukkan beda signifikan pada konsentrasi 1.000 ppm. Sehingga diduga pada konsentrasi 1.000 ppm dengan diameter penghambatan ($0,645 \pm 0,49$) mm merupakan nilai MIC produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris*. Sedangkan pada *Fusarium solanii*, biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP menunjukkan beda signifikan pada kontrol terhadap konsentrasi 4.000 ppm. Sehingga diduga pada konsentrasi 4.000 ppm dengan diameter penghambatan ($0,5 \pm 0,028$) mm merupakan nilai MIC produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Fusarium solanii*.

Karena produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas penghambatan pada kedua mikroba tersebut, maka dilakukan uji berikutnya yaitu dengan menggunakan metode pengenceran dalam tabung.

4.2.2 Metode pengenceran dalam tabung (*tube dilution method*)

Metode pengenceran dalam tabung ini lebih banyak digunakan untuk uji antimikroba yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah suatu agen antimikroba yang diperlukan untuk menghambat perkembangan pertumbuhan secara nyata mikroba setelah diinkubasi selama 24 jam yang umumnya disebut dengan nilai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*), dan atau nilai MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) atau MFC (*Minimal Fungicidal Concentration*) untuk mengetahui efek membunuh bakteri atau fungi dengan lebih jelas (Wistreich, 2003; Bailey and Scott, 1994).

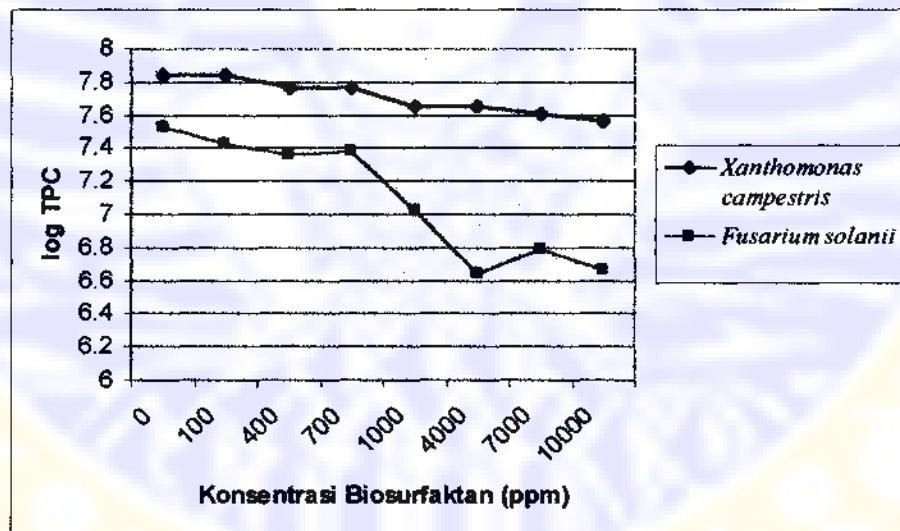
Berdasarkan hasil uji dengan metode cakram kertas, maka kisaran konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP yang diuji aktivitasnya sama dengan uji pada metode cakram kertas yaitu 10.000, 7.000, 4.000, 1.000, 700, 400 dan 100 ppm. Perbandingan antara volume biosurfaktan dengan mikroba uji yang dimasukkan dalam kultur uji adalah 1 : 1. Setelah diinkubasi selama 24 jam secara kualitatif sulit didapatkan hasil dengan pengamatan kultur uji secara visual karena kekeruhan produk biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP. Sehingga pengamatan dilakukan secara kuantitatif yaitu menghitung jumlah koloni dari kultur uji.

Berdasarkan beberapa konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini, menunjukkan hasil bahwa kultur uji *Xanthomonas campestris* mengalami penurunan jumlah sel yang berbanding terbalik dengan konsentrasi biosurfaktan. penurunan jumlah koloni terhadap kontrol menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris*. Begitu juga dengan *Fusarium solanii* yang mengalami penurunan jumlah spora setelah penambahan biosurfaktan.

Hasil uji dengan menggunakan metode pengenceran dalam tabung dapat dilihat pada gambar (lampiran 13). Penurunan jumlah sel dari hasil uji dengan menggunakan metode pengenceran dalam tabung diketahui dari nilai TPC (*Total Plate Count*) yang dapat dilihat pada tabel 4.2 dan gambar 4.2 berikut :

Tabel 4.2 Data Nilai Log TPC (*Total Plate Count*) dan Visualisasi Dilusi dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP Terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*

| Konsentrasi (ppm) | Visualisasi | | Nilai Log TPC | |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | <i>Xanthomonas campestris</i> | <i>Fusarium solanii</i> | <i>Xanthomonas campestris</i> | <i>Fusarium solanii</i> |
| 10.000 | Coklat keruh | Coklat keruh | 7.559 | 6.66 |
| 7.000 | Coklat keruh | Coklat keruh | 7.602 | 6.79 |
| 4.000 | Coklat keruh | Coklat keruh | 7.654 | 6.64 |
| 1.000 | Kuning jernih | Kuning jernih | 7.654 | 7.02 |
| 700 | Kuning jernih | Kuning jernih | 7.762 | 7.38 |
| 400 | Kuning jernih | Kuning jernih | 7.767 | 7.36 |
| 100 | Kuning keruh | Kuning keruh | 7.840 | 7.43 |
| 0 | Kuning keruh | Kuning keruh | 7.845 | 7.53 |



Gambar 4.2 Grafik Nilai Log TPC (*Total Plate Count*) *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* pada Uji Dilusi dengan Berbagai Konsentrasi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP

Produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP lebih menghambat *Fusarium solanii* daripada *Xanthomonas campestris*. *Xanthomonas campestris* mempunyai respon signifikan pada konsentrasi 1.000 ppm. Sedangkan *Fusarium solanii* mempunyai respon signifikan pada konsentrasi 4.000 ppm. Dari kedua hasil metode uji aktivitas penghambatan tersebut, dapat diketahui bahwa metode pengenceran dalam tabung lebih selektif dan hasilnya mendekati metode cakram kertas. Dari hasil tersebut maka penentuan nilai MIC biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* dipertegas dari hasil metode pengenceran dalam tabung. Nilai MBC/MFC produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* diperkirakan diatas 10.000 ppm. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut tentang penentuan nilai MBC/MFC pada konsentrasi biosurfaktan diatas 10.000 ppm. Nilai MIC produk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap kedua mikroba uji yang telah diperoleh dimasukkan dalam tabel 4.3

Tabel 4.3 Nilai MIC Produk Kasar Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP Terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*

| <i>Xanthomonas campestris</i> MIC (ppm) | <i>Fusarium solanii</i> MIC (ppm) |
|--|--------------------------------------|
| 1.000 | 4.000 |

Dalam penelitian Bais *et al* (2004) menunjukkan bahwa surfaktan yang merupakan produk murni biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan pada beberapa mikroba dengan konsentrasi minimal penghambatan (MIC) yang berbeda-beda antara lain: *Xanthomonas campestris*

(25 ppm) dan *Fusarium solanii* (75 ppm)). Meskipun pada penelitian Yuliani (2004) diketahui bahwa produk murni biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP tersebut berupa lipopeptida, sama seperti biosurfaktan *Bacillus subtilis*. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP yang diujikan merupakan produk kasar yang belum dimurnikan dan ada kemungkinan jika produk murni biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik daripada produk murni biosurfaktan *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari luar negeri. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut tentang uji penghambatan produk biosurfaktan murni pada mikroba lainnya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dapat menghambat pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*.
2. Konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*. Semakin besar konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP, semakin besar pula diameter daerah penghambatan pertumbuhan mikroba uji.
3. Nilai MIC biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP terhadap *Xanthomonas campestris* sebesar 1.000 ppm dengan diameter daerah penghambatan sebesar (0.645 ± 0.49) mm. Sedangkan untuk *Fusarium solanii* sebesar 4.000 ppm dengan diameter daerah penghambatan sebesar (0.5 ± 0.028) mm.

5.2 Saran

1. Untuk penentuan nilai MBC/MFC pada *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii* poduk kasar biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP hendaknya dilakukan pada konsentrasi diatas 10.000 ppm.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang uji potensial penghambatan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP murni terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*.

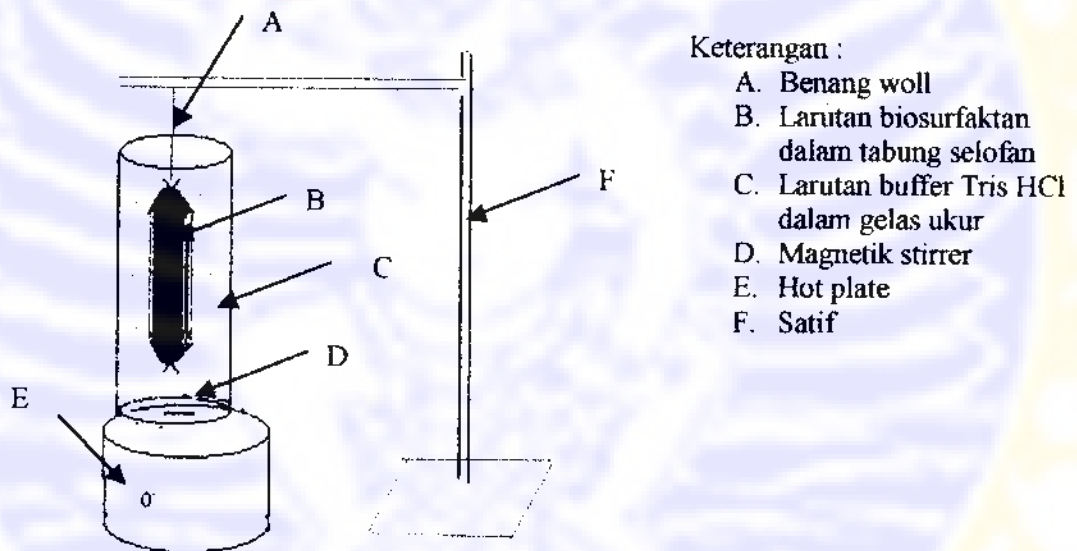
DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, A. L. 2003. **Ilmu Penyakit Tumbuhan**. Bayumedia, Malang. 9 - 49
- Anonim. 2000. Bacterial Diseases of Beans. **Departement of Crop Science**. Urbana – Champaign. 2 - 5
- Anonim. 2003. Aplikasi Bioteknologi dalam Upaya Peningkatan Efisiensi Agrobisnis yang Berkelanjutan. **Seminar Lokakarya UPN Veteran**, Yogyakarta. 1-5
- Bailey, W. R. and Scott, E.G. 1994 . **Diagnostic Microbiology, fourth edition**. The CV Mosby Company, Saint louis. 168 - 187
- Bais, H.P., Fall, R. and Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* Against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. **Horticultur and Landscape Architecture**, Colorado. 134 : 307 - 319
- Bertrand, J. C., Bonin, P., Goutx, M., Gauthier, M., and Mille, G. 1994. The Potential Application of Biosurfactant in Combating Hydrocarbon Pollution In Marine Environment. **Microbiology**. 145: 53-56.
- Carillo, G.G., Mar daraz, C., Pitta Alvarez. and Guiliettu, A.M. 1996. Isolation and Selection of Biosurfactant Producing Bacteria. **Microbiology and Biotechnology** . 12 : 82 - 84
- Cooper, D.G., and Jazic, J.E. 1980. Surface Active Compounds from Microorganism. **Applied Microbiologi**. 26 : 229 –253
- Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial Productin of Surfactant and Commersial Potential. **Microbiology and Molecular Review**. 61 : 47 – 64
- Duriat, A.S. 2003. **Petunjuk Lapang Penyakit Pada Tanaman Cabai dan Pengendaliannya**. Balitbang. Lembang. 2 - 5
- Gandjar, I., Samson, R. A., Tweel – Vermeulen, K., Oetari, A. dan Santoso, I. 1999. **Pengenalan Kapang Tropik Umum**, Yayasan obor, Jakarta. 62-68
- Guerra Santos, L., Kapelli, O. and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continous Culture with Glucose as Carbon **Applied Environmental Microbiology**. 48 :301 - 305

Lampiran 1

Cara Kerja Persiapan Dialisis dan Gambar Alat Dialisis

Tabung dialisis dipotong sepanjang 10 – 20 cm, kemudian dididihkan selama 10 menit dalam sejumlah volume larutan yang mengandung natrium bikarbonat 2% (b/v) dan 1mM EDTA (pH = 8,0). Selanjutnya dibilas dengan akuades dan dididihkan sekali lagi selama 10 menit dalam larutan 1 mM EDTA (pH = 8,0). Tabung dialisis dibiarkan dingin, kemudian disimpan dalam larutan EDTA tersebut pada 4⁰ C. Sebelum digunakan, tabung dialisis dikeluarkan dari larutan EDTA dan dibilas bagian luar dan didalamnya dengan akuades.



Gambar Alat dialisis

Lampiran 2**Konversi Konsentrasi Supernatan pada Uji Pendahuluan Cakram Kertas**

Setelah didialisis larutan biosurfaktan sejumlah 69 ml di liofilisasi. Berat biosurfaktan hasil liofilisasi 0,53 g sehingga dalam 20 µl terkandung biosurfaktan sebesar 0,0015 g. konsentrasi biosurfaktan yang diteteskan pada biakan sebesar 7500 ppm atau 7,5 g/l.

Secara matematis dapat dijabarkan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} 0.53 \text{ g} &= 69 \text{ ml} \\ 0.075 \text{ g} &= 1 \text{ ml} \\ 0.0015 \text{ g} &= 20 \text{ ml} \\ 0.15 \text{ mg} &= 20 \mu\text{l} \\ 150 \mu\text{g} / 20 \mu\text{l} &= 7.5 \text{ g/l} \\ &= 7.500 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Lampiran 3

Aktivitas Emulsi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP pada Minyak Uji dan Foto Stabilitas Emulsi pada Minyak Uji

Aktivitas Emulsi Biosurfaktan

| Waktu (menit ke...) | Persen emulsifikasi (kerosin) | Persen emulsifikasi (Solar) |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 0,28 | 0,20 |
| 10 | 0,28 | 0,19 |
| 20 | 0,22 | 0,19 |
| 30 | 0,2 | 0,16 |
| 40 | 0,2 | 0,15 |
| 50 | 0,2 | 0,14 |
| 60 | 0,2 | 0,14 |

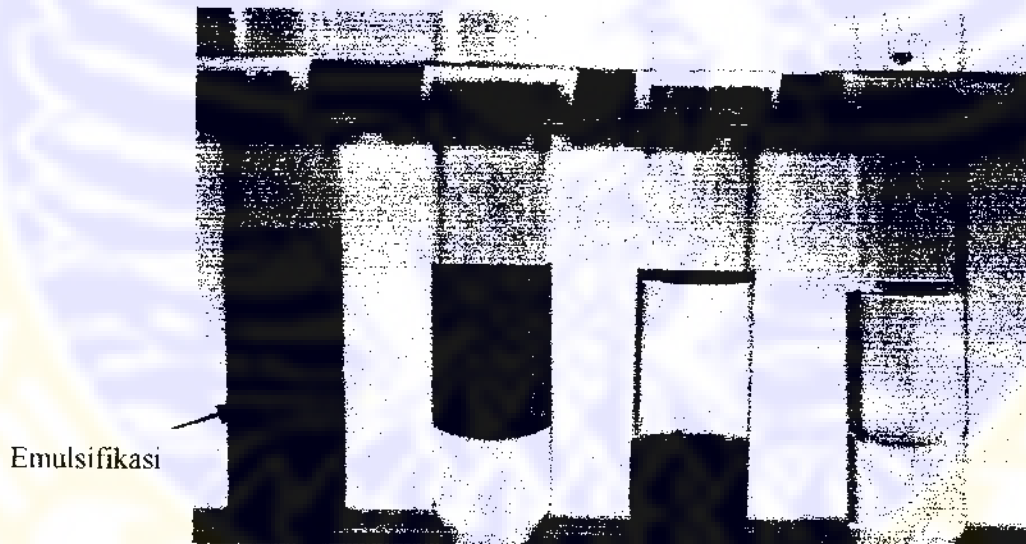


Foto Stabilitas Emulsi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP pada Minyak Uji Solar dan Kerosin

Lampiran 4**Komposisi Media Uji Penghambatan Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP****Mueller Hinton Agar**

| Komposisi | g/l |
|--------------------|------------|
| Ekstrak daging | 300 |
| Casein hydrolysate | 17.5 |
| Tepung / Starch | 1.5 |
| Agar | 17 |

Mueller Hinton Broth

| Komposisi | g/l |
|--------------------|------------|
| Ekstrak daging | 300 |
| Casein hydrolysate | 17.5 |
| Tepung / Starch | 1.5 |

Lampiran 5

Hasil analisis varian (ANOVA) satu arah berbagai konsentrasi biosurfaktan terhadap *Xanthomoas campestris*

Oneway**Descriptives**

Diameter Halo XC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|----------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| .00 | 4 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| 100.00 | 4 | .0950 | .01291 | .00645 | .0745 | .1155 | .08 | .11 |
| 400.00 | 4 | .1200 | .02828 | .01414 | .0750 | .1650 | .10 | .16 |
| 700.00 | 4 | .3075 | .13074 | .06537 | .0995 | .5155 | .21 | .50 |
| 1000.00 | 4 | .6450 | .49075 | .24537 | -.1359 | 1.4259 | .16 | 1.13 |
| 4000.00 | 4 | .8525 | .46700 | .23350 | .1094 | 1.5956 | .22 | 1.22 |
| 7000.00 | 4 | 1.0650 | .49696 | .24848 | .2742 | 1.8558 | .65 | 1.66 |
| 10000.00 | 4 | 1.4500 | .10520 | .05260 | 1.2826 | 1.6174 | 1.30 | 1.54 |
| Total | 32 | .5669 | .56545 | .09996 | .3630 | .7707 | .00 | 1.66 |

Test of Homogeneity of Variances

Diameter Halo XC

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 12.505 | 7 | 24 | .000 |

ANOVA

Diameter Halo XC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 7.707 | 7 | 1.101 | 11.983 | .000 |
| Within Groups | 2.205 | 24 | .092 | | |
| Total | 9.912 | 31 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Halo XC

LSD

| (I) Konsentrasi | (J) Konsentrasi | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| .00 | 100.00 | -.0950 | .21433 | .662 | -.5374 | .3474 |
| | 400.00 | -.1200 | .21433 | .581 | -.5624 | .3224 |
| | 700.00 | -.3075 | .21433 | .164 | -.7499 | .1349 |
| | 1000.00 | -.6450* | .21433 | .006 | -1.0874 | -.2026 |
| | 4000.00 | -.8525* | .21433 | .001 | -1.2949 | -.4101 |
| | 7000.00 | -1.0650* | .21433 | .000 | -1.5074 | -.6226 |
| | 10000.00 | -1.4500* | .21433 | .000 | -1.8924 | -1.0076 |
| 100.00 | .00 | .0950 | .21433 | .662 | -.3474 | .5374 |
| | 400.00 | -.0250 | .21433 | .908 | -.4674 | .4174 |
| | 700.00 | -.2125 | .21433 | .331 | -.6549 | .2299 |
| | 1000.00 | -.5500* | .21433 | .017 | -.9924 | -.1076 |
| | 4000.00 | -.7575* | .21433 | .002 | -1.1999 | -.3151 |
| | 7000.00 | -.9700* | .21433 | .000 | -1.4124 | -.5276 |
| | 10000.00 | -1.3550* | .21433 | .000 | -1.7974 | -.9126 |
| 400.00 | .00 | .1200 | .21433 | .581 | -.3224 | .5624 |
| | 100.00 | .0250 | .21433 | .908 | -.4174 | .4674 |
| | 700.00 | -.1875 | .21433 | .390 | -.6299 | .2549 |
| | 1000.00 | -.5250* | .21433 | .022 | -.9674 | -.0826 |
| | 4000.00 | -.7325* | .21433 | .002 | -1.1749 | -.2901 |
| | 7000.00 | -.9450* | .21433 | .000 | -1.3874 | -.5026 |
| | 10000.00 | -1.3300* | .21433 | .000 | -1.7724 | -.8876 |
| 700.00 | .00 | .3075 | .21433 | .164 | -.1349 | .7499 |
| | 100.00 | .2125 | .21433 | .331 | -.2299 | .6549 |
| | 400.00 | .1875 | .21433 | .390 | -.2549 | .6299 |
| | 1000.00 | -.3375 | .21433 | .128 | -.7799 | .1049 |
| | 4000.00 | -.5450* | .21433 | .018 | -.9874 | -.1026 |
| | 7000.00 | -.7575* | .21433 | .002 | -1.1999 | -.3151 |
| | 10000.00 | -1.1425* | .21433 | .000 | -1.5849 | -.7001 |
| 1000.00 | .00 | .6450* | .21433 | .006 | .2026 | 1.0874 |
| | 100.00 | .5500* | .21433 | .017 | .1076 | .9924 |
| | 400.00 | .5250* | .21433 | .022 | .0826 | .9674 |
| | 700.00 | .3375 | .21433 | .128 | -.1049 | .7799 |
| | 4000.00 | -.2075 | .21433 | .343 | -.6499 | .2349 |
| | 7000.00 | -.4200 | .21433 | .062 | -.8624 | .0224 |
| | 10000.00 | -.8050* | .21433 | .001 | -1.2474 | -.3626 |

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Halo XC

LSD

| (I) Konsentrasi | (J) Konsentrasi | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 4000.00 | .00 | .8525* | .21433 | .001 | .4101 | 1.2949 |
| | 100.00 | .7575* | .21433 | .002 | .3151 | 1.1999 |
| | 400.00 | .7325* | .21433 | .002 | .2901 | 1.1749 |
| | 700.00 | .5450* | .21433 | .018 | .1026 | .9874 |
| | 1000.00 | .2075 | .21433 | .343 | -.2349 | .6499 |
| | 7000.00 | -.2125 | .21433 | .331 | -.6549 | .2299 |
| | 10000.00 | -.5975* | .21433 | .010 | -1.0399 | -.1551 |
| 7000.00 | .00 | 1.0650* | .21433 | .000 | .6226 | 1.5074 |
| | 100.00 | .9700* | .21433 | .000 | .5276 | 1.4124 |
| | 400.00 | .9450* | .21433 | .000 | .5026 | 1.3874 |
| | 700.00 | .7575* | .21433 | .002 | .3151 | 1.1999 |
| | 1000.00 | .4200 | .21433 | .062 | -.0224 | .8624 |
| | 4000.00 | .2125 | .21433 | .331 | -.2299 | .6549 |
| | 10000.00 | -.3850 | .21433 | .085 | -.8274 | .0574 |
| 10000.00 | .00 | 1.4500* | .21433 | .000 | 1.0076 | 1.8924 |
| | 100.00 | 1.3550* | .21433 | .000 | .9126 | 1.7974 |
| | 400.00 | 1.3300* | .21433 | .000 | .8876 | 1.7724 |
| | 700.00 | 1.1425* | .21433 | .000 | .7001 | 1.5849 |
| | 1000.00 | .8050* | .21433 | .001 | .3626 | 1.2474 |
| | 4000.00 | .5975* | .21433 | .010 | .1551 | 1.0399 |
| | 7000.00 | .3850 | .21433 | .085 | -.0574 | .8274 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 6

Hasil analisis varian (ANOVA) satu arah berbagai konsentrasi biosurfaktan terhadap *Fusarium solanii*

Oneway**Descriptives**

Halo (mm)

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| .00 | 4 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| 100.00 | 4 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| 400.00 | 4 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| 700.00 | 4 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| 1000.00 | 4 | .0950 | .01291 | .00645 | .0745 | .1155 | .08 | .11 |
| 4000.00 | 4 | .5000 | .02828 | .01414 | .4550 | .5450 | .48 | .54 |
| 7000.00 | 4 | 2.4025 | .40623 | .20312 | 1.7561 | 3.0489 | 1.85 | 2.75 |
| 10000 | 4 | 3.5875 | .06946 | .03473 | 3.4770 | 3.6980 | 3.49 | 3.65 |
| Total | 32 | .8231 | 1.32514 | .23425 | .3454 | 1.3009 | .00 | 3.65 |

Test of Homogeneity of Variances

Halo (mm)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 7.747 | 7 | 24 | .000 |

ANOVA

Halo (mm)

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 53.924 | 7 | 7.703 | 360.779 | .000 |
| Within Groups | .512 | 24 | .021 | | |
| Total | 54.436 | 31 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Halo (mm)

LSD

| (I) Konsentrasi | (J) Konsentrasi | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| .00 | 100.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 400.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 700.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 1000.00 | -.0950 | .10332 | .367 | -.3083 | .1183 |
| | 4000.00 | -.5000* | .10332 | .000 | -.7133 | -.2867 |
| | 7000.00 | -2.4025* | .10332 | .000 | -2.6158 | -2.1892 |
| | 10000.00 | -3.5875* | .10332 | .000 | -3.8008 | -3.3742 |
| 100.00 | .00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 400.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 700.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 1000.00 | -.0950 | .10332 | .367 | -.3083 | .1183 |
| | 4000.00 | -.5000* | .10332 | .000 | -.7133 | -.2867 |
| | 7000.00 | -2.4025* | .10332 | .000 | -2.6158 | -2.1892 |
| | 10000.00 | -3.5875* | .10332 | .000 | -3.8008 | -3.3742 |
| 400.00 | .00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 100.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 700.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 1000.00 | -.0950 | .10332 | .367 | -.3083 | .1183 |
| | 4000.00 | -.5000* | .10332 | .000 | -.7133 | -.2867 |
| | 7000.00 | -2.4025* | .10332 | .000 | -2.6158 | -2.1892 |
| | 10000.00 | -3.5875* | .10332 | .000 | -3.8008 | -3.3742 |
| 700.00 | .00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 100.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 400.00 | .0000 | .10332 | 1.000 | -.2133 | .2133 |
| | 1000.00 | -.0950 | .10332 | .367 | -.3083 | .1183 |
| | 4000.00 | -.5000* | .10332 | .000 | -.7133 | -.2867 |
| | 7000.00 | -2.4025* | .10332 | .000 | -2.6158 | -2.1892 |
| | 10000.00 | -3.5875* | .10332 | .000 | -3.8008 | -3.3742 |
| 1000.00 | .00 | .0950 | .10332 | .367 | -.1183 | .3083 |
| | 100.00 | .0950 | .10332 | .367 | -.1183 | .3083 |
| | 400.00 | .0950 | .10332 | .367 | -.1183 | .3083 |
| | 700.00 | .0950 | .10332 | .367 | -.1183 | .3083 |
| | 4000.00 | -.4050* | .10332 | .001 | -.6183 | -.1917 |
| | 7000.00 | -2.3075* | .10332 | .000 | -2.5208 | -2.0942 |
| | 10000.00 | -3.4925* | .10332 | .000 | -3.7058 | -3.2792 |

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Halo (mm)

LSD

| (I) Konsentrasi | (J) Konsentrasi | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 4000.00 | .00 | .5000* | .10332 | .000 | .2867 | .7133 |
| | 100.00 | .5000* | .10332 | .000 | .2867 | .7133 |
| | 400.00 | .5000* | .10332 | .000 | .2867 | .7133 |
| | 700.00 | .5000* | .10332 | .000 | .2867 | .7133 |
| | 1000.00 | .4050* | .10332 | .001 | .1917 | .6183 |
| | 7000.00 | -1.9025* | .10332 | .000 | -2.1158 | -1.6892 |
| | 10000.00 | -3.0875* | .10332 | .000 | -3.3008 | -2.8742 |
| 7000.00 | .00 | 2.4025* | .10332 | .000 | 2.1892 | 2.6158 |
| | 100.00 | 2.4025* | .10332 | .000 | 2.1892 | 2.6158 |
| | 400.00 | 2.4025* | .10332 | .000 | 2.1892 | 2.6158 |
| | 700.00 | 2.4025* | .10332 | .000 | 2.1892 | 2.6158 |
| | 1000.00 | 2.3075* | .10332 | .000 | 2.0942 | 2.5208 |
| | 4000.00 | 1.9025* | .10332 | .000 | 1.6892 | 2.1158 |
| | 10000.00 | -1.1850* | .10332 | .000 | -1.3983 | -.9717 |
| 10000.00 | .00 | 3.5875* | .10332 | .000 | 3.3742 | 3.8008 |
| | 100.00 | 3.5875* | .10332 | .000 | 3.3742 | 3.8008 |
| | 400.00 | 3.5875* | .10332 | .000 | 3.3742 | 3.8008 |
| | 700.00 | 3.5875* | .10332 | .000 | 3.3742 | 3.8008 |
| | 1000.00 | 3.4925* | .10332 | .000 | 3.2792 | 3.7058 |
| | 4000.00 | 3.0875* | .10332 | .000 | 2.8742 | 3.3008 |
| | 7000.00 | 1.1850* | .10332 | .000 | .9717 | 1.3983 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 7

Foto *Bacillus subtilis* 3KP dan Kultur *Bacillus subtilis* 3KP Dalam Molase



Foto *Bacillus subtilis* 3KP yang Ditumbuhkan Dalam Media NA

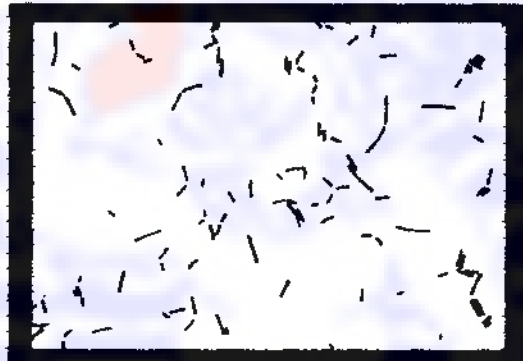


Foto *Bacillus subtilis* 3KP Diamati Secara Mikroskopis Dengan Perbesaran 10 X 100



Foto Kultur *Bacillus subtilis* 3KP Dalam Molase

Lampiran 8

Foto Mikroba Uji (*Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*)



Foto *Xanthomonas campestris* yang Ditumbuhkan Dalam Media NA

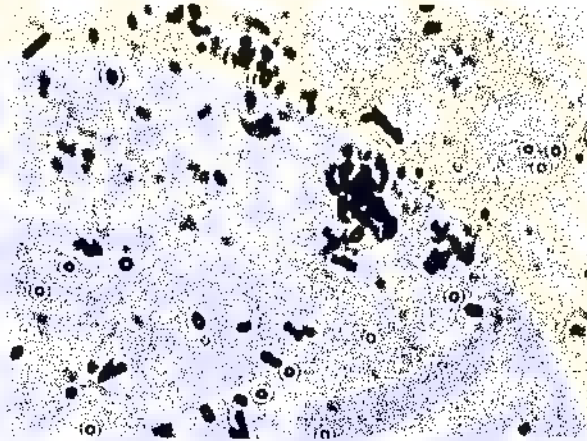


Foto *Xanthomonas campestris* Diamati Secara Mikroskopis Dengan Perbesaran 10 X 100



Foto *Fusarium solanii* yang Ditumbuhkan Dalam Media PDA

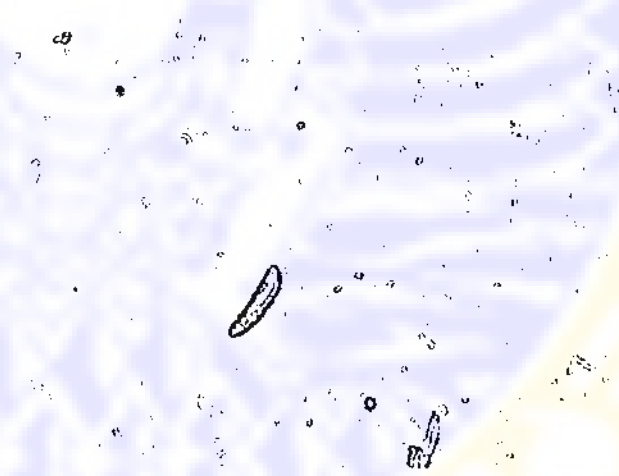


Foto Makrokonidia *Fusarium solanii* Diamati Secara Mikroskopis Dengan Perbesaran 10 X 100

Lampiran 9

Foto Hasil Liofilisasi Produk Biosurfaktan dan Larutan Biosurfaktan



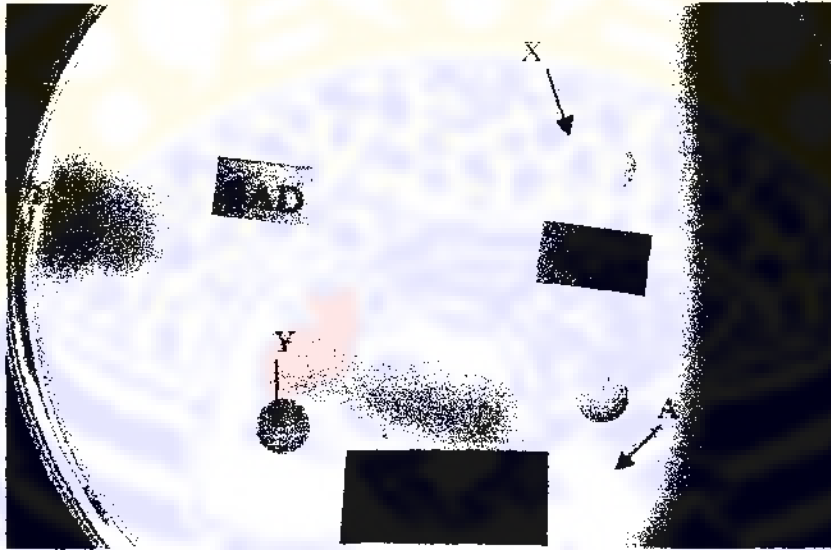
Foto Hasil Liofilisasi Produk Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP



Foto Larutan Produk Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP

Lampiran 10

Foto Uji Pendahuluan Penghambatan Biosurfaktan Dalam Supernatan Terhadap *Xanthomonas campestris*

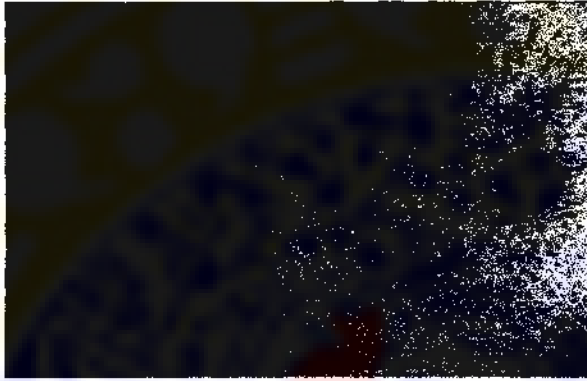


Keterangan :

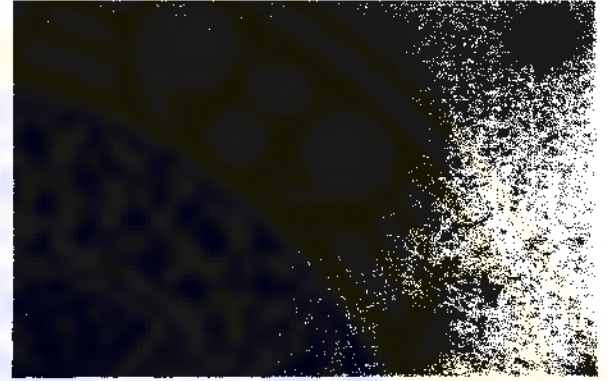
- X. Daerah Penghambatan (fialo)
- Y. Cakram kertas
- A. *Xanthomonas campestris* yang Ditanam Dengan Metode *pour plate*
- SAD. Supernatan *After Dialisis*
- BK. Biosurfaktan Kasar sebelum di dialisis

Lampiran 11

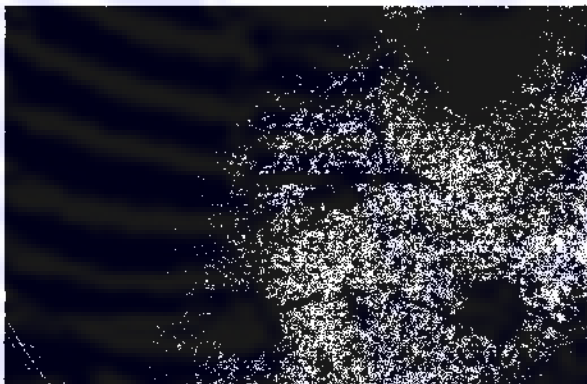
Foto Diameter Daerah Penghambatan Biosurfaktan Berbagai Konsentrasi Terhadap *Xanthomonas campestris*



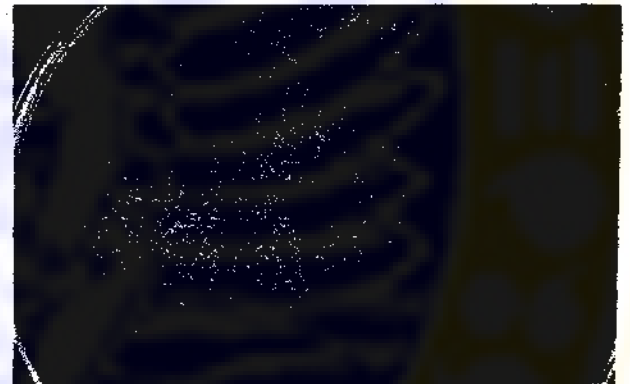
A



B



C



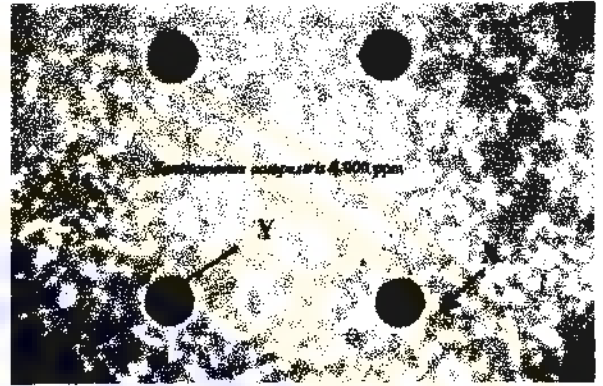
D

Keterangan :

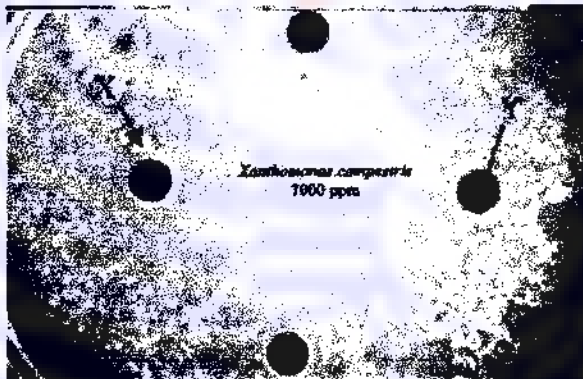
- A. Foto Kontrol
- B. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 100 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- C. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 400 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- D. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 700 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- X. Daerah Penghambatan (halo)
- Y. Cakram Kertas



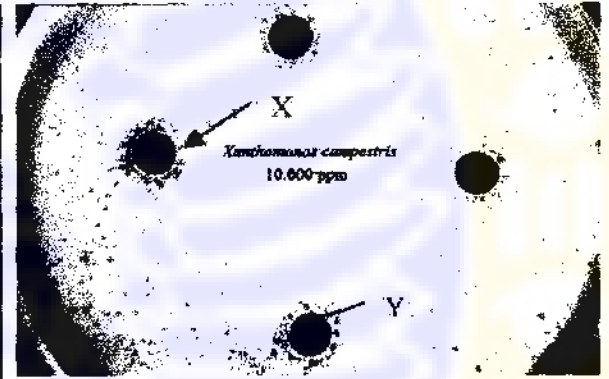
E



F



G



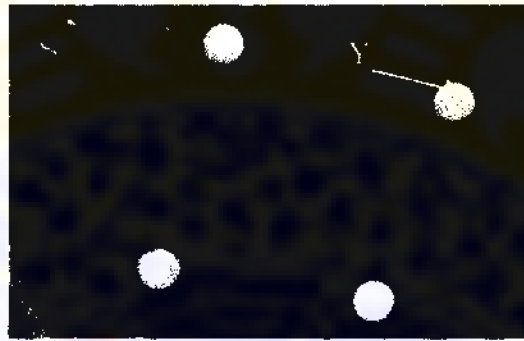
H

Keterangan :

- E. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 1000 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- F. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 4000 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- G. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 7000 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- H. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 10000 ppm Terhadap *Xanthomonas campestris*
- X. Daerah Penghambatan (halo)
- Y. Cakram Kertas

Lampiran 12

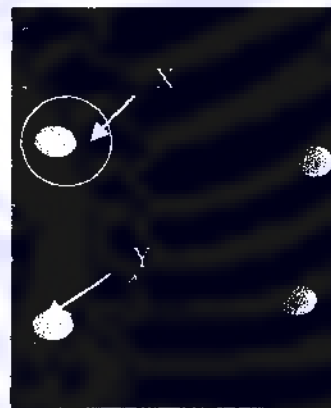
Foto Diameter Daerah Penghambatan Biosurfaktan Berbagai Konsentrasi Terhadap *Fusarium solanii*



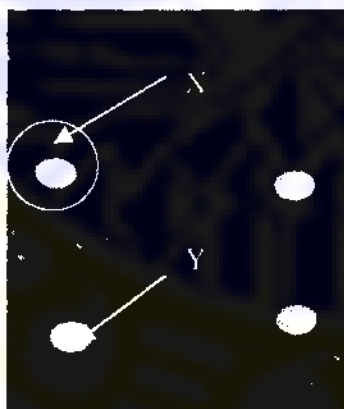
A



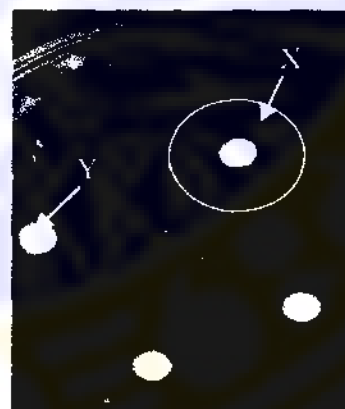
B



C



D



E

Keterangan :

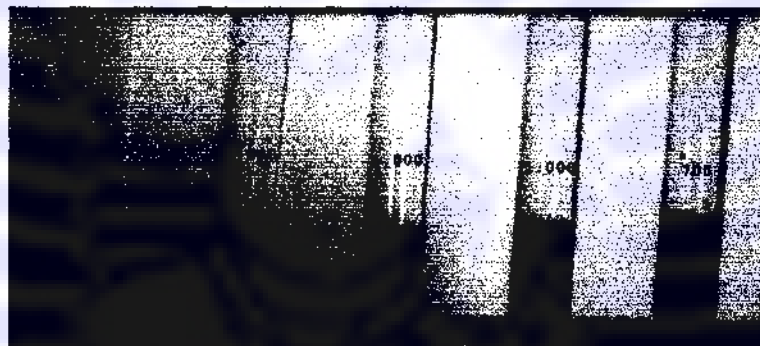
- A. Foto Kontrol
- B. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 1000 ppm Terhadap *Fusarium solanii*
- C. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 4000 ppm Terhadap *Fusarium solanii*
- D. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 7000 ppm Terhadap *Fusarium solanii*
- E. Foto Diameter Daerah Penghambatan (halo) Biosurfaktan Dengan Konsentrasi 10.000 ppm Terhadap *Fusarium solanii*
- X. Daerah Penghambatan (halo)
- Y. Cakram Kertas

Lampiran 13

Foto Hasil Dilusi Biosurfaktan Berbagai Konsentrasi Terhadap *Xanthomonas campestris* dan *Fusarium solanii*



Hasil Dilusi Biosurfaktan Terhadap *Xanthomonas campestris* (0 – 400 ppm)



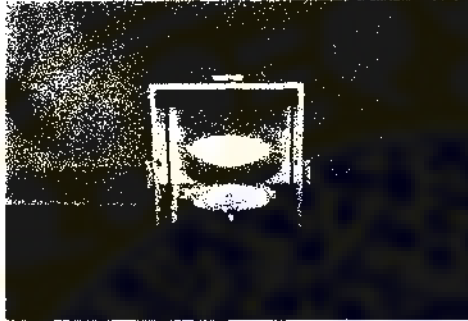
Hasil Dilusi Biosurfaktan Terhadap *Xanthomonas campestris* (700 – 10.000 ppm)



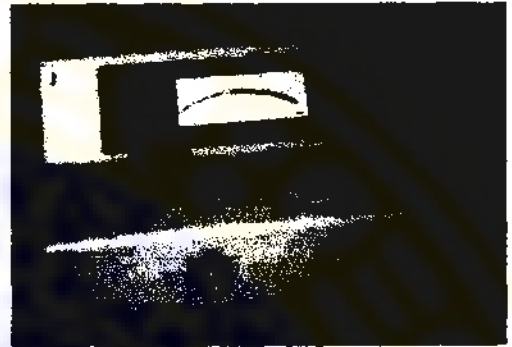
Hasil Dilusi Biosurfaktan Terhadap *Fusarium solanii* (0 – 10.000 ppm)

Lampiran 14

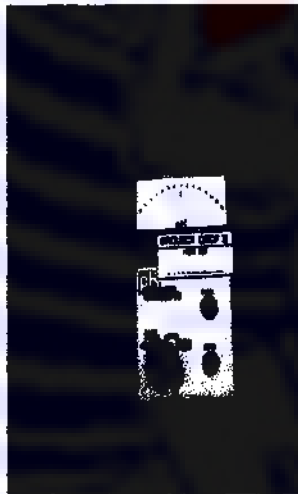
Foto Alat – Alat Penelitian



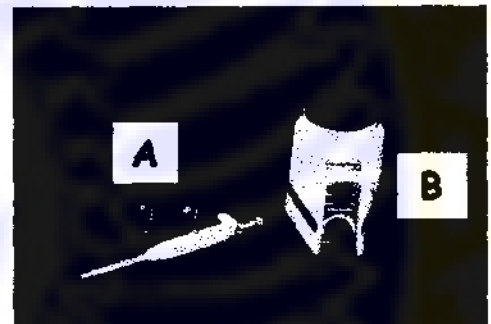
Neraca Analitik



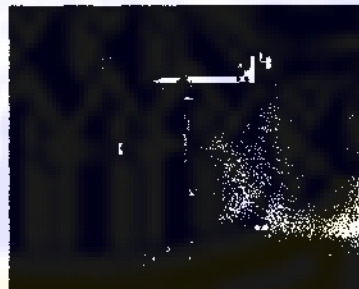
Spektrofotometer



pH meter



A. Mikropipet
B. Vortek



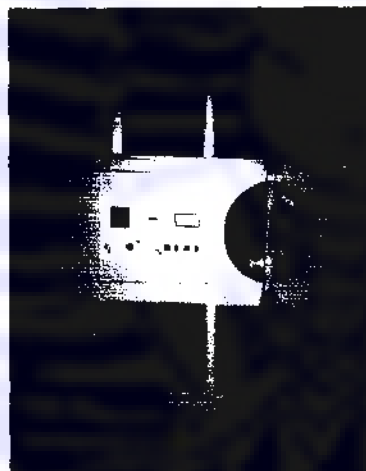
Tensiometer Du Nouy



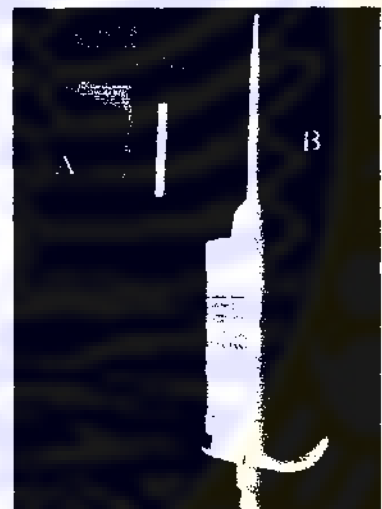
Mikroskop



Shaker Inkubator



Freeze Dryer



A. Jangka Sorong
B. Mikropipet