

EKSPLORASI *Bacillus* spp., DARI PERAKARAN KUBIS SEBAGAI AGEN ANTAGONIS *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

**Fajar Dwi Agustina Wati¹, Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti^{1*},
Hardian Susilo Addy¹,**

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

*Email : agustina.faperta@gmail.com

ABSTRACT

Bacillus spp isolation was taken from healthy cabbage rhizosphere soil baked in oven for 1 hours in 80° C and planted on YPGA media. 24 isolates of *Bacillus* spp were gram positive and has negative hypersensitive. The isolates were tested for inhibition zone against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, there are 12 isolates that form the obstacle zone. The 12 isolates of *Bacillus* spp have different sizes and form a resistance zone and have a bacteriostatic inhibitory mechanism, each of isolate has 2 representative sample for categorized as large, medium and small obstacles. There were 6 selected isolates, then categorized in different characteristic which consist of oxidase, catalase, and starch hydrolysis and having similarity in their characteristic results.

Keywords : *Bacillus*, Cabbage, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

ABSTRAK

Isolasi *Bacillus* spp diambil dari tanah rhizosfer kubis sehat di oven dengan suhu 80°C selama 1 jam dan ditumbuhkan pada media YPGA. Sebanyak 24 isolat *Bacillus* spp merupakan gram positif dan hipersensitif bersifat negatif. Isolat tersebut dilakukan uji zona penghambatan terhadap *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, terdapat 12 isolat yang membentuk zona hambatan. Ke 12 isolat *Bacillus* spp tersebut memiliki perbedaan ukuran daam membentuk zona hambatan dan memiliki mekanisme penghambatan bakteristatik, isolat tersebut masing-masing diambil 2 perwakilan untuk kategori zona hambatan besar, sedang dan kecil. Terdapat 6 isolat terpilih, kemudian dilakukan karakterisasi yang terdiri dari uji oksidase, katalase, dan hidrolisa pati dan memiliki kesamaan dalam hasil karakteristiknya.

Kata kunci: *Bacillus*, Kubis, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

How to cite: Wati FD., S D Nurcahyanti, dan H S Addy. 2017. Eksplorasi *Bacillus* spp., dari Perakaran Kubis Sebagai Agen Antagonis *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1(1): xx-xx.

PENDAHULUAN

Kubis (*Brassica oleracea* L.) merupakan salah satu jenis sayuran yang berasal dari daerah subtropis. Kubis merupakan tanaman yang banyak mengandung vitamin, mineral, karbohidrat dan protein yang cukup bagi tubuh manusia. Selain itu kubis merupakan komoditas tanaman sayuran yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi meskipun nilai jualnya sangat dipengaruhi oleh kualitas hasil tampilan visualnya (Mujib dkk., 2014).

Beberapa tahun terakhir ini, kubis termasuk enam kelompok besar sayuran segar yang banyak diekspor. Produksi kubis Propinsi Jawa Timur pada tahun 2014 mencapai 201,358 ton, sedangkan pada tahun 2015 mengalami penurunan menjadi 199.311 ton (BPS dan DJH, 2017). Penurunan produksi bisa terjadi karena beberapa faktor yaitu lahan panen yang menyempit dan juga akibat gangguan OPT.

Penyakit penting dari tanaman kubis ini salah satunya adanya busuk hitam yang diakibatkan oleh serangan patogen *Xantomonas campestris* pv. *campestris*. Mekanisme serangannya yaitu bakteri masuk ke daun melalui hidatoda di tepi daun atau luka dengan membentuk lesi V akibat adanya penyumbatan pembuluh dan menyebabkan infeksi sistemik (Mau et al., 2011). Serangan patogen tersebut menimbulkan gejala yaitu berawal adanya daerah berwarna kuning pada bagian tepi daun, kemudian meluas hingga ke bagian tengah. Daerah tulang daun ini akan berubah berwarna menjadi coklat tua dan

hitam. Pada tingkatan yang lebih lanjut penyakit meluas terus melalui tulang-tulang daun dan masuk ke dalam batang. Pengamatan melalui penampang melintang tulang daun atau batang yang sakit terdapat berkas pembuluh yang berwarna gelap. Jaringan helaian daun yang sakit akan mengering, dan menjadi selaput dengan tulang-tulang daun berwarna hitam. Irisan melintang dari petiole (tangkai daun) menunjukkan jaringan xylem yang seperti tersumbat serta berwarna hitam (Rumahlewang, 2011).

Pengendalian OPT pada umumnya menggunakan pestisida kimia. Aplikasi pestisida secara tidak bijaksana dapat merusak kesehatan lingkungan dan manusia hal tersebut dapat terjadi dikarenakan bahan kimia yang diaplikasikan tidak sepenuhnya mengenai OPT sasaran. Sekitar 30% pestisida terbuang ke tanah pada musim kemarau, dan 80% pada musim hujan yang kemudian pestisida ini akan terbawa oleh air (Mujib dkk., 2014). Penggunaan pestisida kimia juga dapat meninggalkan residu pada tanah yang berbahaya bagi mikroorganisme nonpatogen, serta penggunaan pestisida secara terus-menerus dalam jumlah yang besar mengakibatkan matinya musuh alami dan menimbulkan resistensi patogen, oleh sebab itu perlu diupayakan cara lain yang lebih aman (Panjaitan, 2014).

Pengendalian penyakit yang ramah lingkungan diperlukan untuk menjaga keseimbangan ekosistem. Pengendalian ramah lingkungan dapat menggunakan agen hayati, diantaranya *Bacillus* spp, *Pseudomonas*

fluorescense, *Coryne bacterium*, dan sebagainya. Salah satu pengendalian yang ramah lingkungan dengan cara menggunakan agen pengendali hayati seperti bakteri *Bacillus* spp. (Handoko, 2014). Menurut Stein (2005) dalam Abidin, dkk (2015) bahwa *Bacillus* dapat mengeluarkan senyawa antimikroba yang terdiri dari basitrasin, basilin, basilomisin, difisidin, oksidifisidin, lesitinase, subtilisin selain itu juga menghasilkan senyawa fengymycin yang diketahui sebagai antifungal, dan banyak senyawa peptid antibiotik lainnya yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. Pemanfaatan *Bacillus* spp.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember .

Isolasi dan Karakterisasi *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* diisolasi dengan metode goresan. Bagian tanaman yang terserang dipotong dengan menggunakan *cutter*, kemudian diambil setengah bagian yang sakit dan setengah bagian yang sehat. Jaringan tersebut selanjutnya disterilkan dengan merendamnya didalam larutan *alkohol* 70% selama 3 menit, kemudian dibilas dengan cara merendamnya ke dalam aquades steril sebanyak 2 kali (Panjaitan dkk., 2014).

Pencirian Bakteri Xcc, yang terdiri dari uji gram, uji hipersensitif daun tembakau, uji patogenesitas, uji hidrolisa pati dan uji sumber karbon.

Uji Gram mengambil isolat

yang telah dieksplor dari rizosfer tanaman kentang dan telah diuji mampu menekan penyakit layu bakteri pada tanaman kentang dan tomat serta mampu meningkatkan hasil tomat menurut Prihatiningsih dan Soedarmo (dalam Prihatiningsih dkk, 2010). *Bacillus amyloliquefaciens* dapat menghambat *F. Solani* sebesar 95,20% dengan diameter 23,07mm. *B. cereus* dapat menghambat *F. Solani* sebesar 55,70% dengan diameter 23,07mm (Ajilogba *et al.*, 2013). *Bacillus* sp B8 dapat menghambat pertumbuhan *F. Oxysporum* sebesar 66,67% (Rahayuniati dan Mugiastuti, 2012).

bakteri patogen diambil sebanyak 1 jarum ose dan diletakkan pada gelas obyek dan kemudian ditetesi dengan menggunakan larutan KOH 3%. Isolat bakteri dan KOH 3% diaduk dan dicampur hingga merata. Jarum ose diangkat secara perlahan, jika isolat tersebut lengket atau terangkat maka bakteri tersebut memiliki Gram negatif, akan tetapi jika tidak lengket maka bakteri tersebut memiliki Gram positif (Schaad *et al.*, 2001).

Uji Hipersensitif daun tembakau mengambil suspensi inokulum dari isolat patogen dengan kerapatan 1×10^8 cfu/ml diinfiltrasikan pada daun tembakau, kemudian diinkubasi selama 48 jam atau hingga munculnya gejala hipersensitif. Jika muncul gejala hipersensitif maka isolat yang diuji merupakan bakteri patogen (Simatupang, 2008).

Uji Patogenesitas mengambil isolat bakteri patogen yang berumur 48 jam, kemudian disuspensikan

menggunakan air steril. Gunting steril dicelupkan pada suspensi tersebut kemudian digunakan untuk memotong daun tanaman kubis. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga muncul gejala nekrosis yang menunjukkan bahwa isolat tersebut bakteri patogen tanaman.

Uji Hirolisa pati dilakukan dengan mengambil isolat bakteri patogen yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada medium pati, kemudian diinkubasikan selama 3-5 hari. Setelah berumur 5 hari, medium ditetesi dengan reagen pati. Reaksi positif terjadi apabila disekitar koloni bakteri yang tumbuh menjadi bening, reaksi negatif apabila di sekitar koloni bakteri menjadi gelap/berwarna biru tua (Schaad *et al.*, 2001).

Uji Sumber karbon (Glukosa) mengambil suspensi isolat bakteri patoge dimasukkan pada media yang mengandung sumber karbon kemudian diinkubasikan pada suhu 28-32°C selama 5 hari. Reaksi positif terjadi apabila terdapat perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning (Schaad *et al.*, 2001).

Isolasi *Bacillus* spp. dari rhizosfer tanaman kubis

Sampel tanah untuk isolasi *Bacillus* spp dari perakaran kubis sehat yang berada di Desa Sumberrejo, Kecamatan Ambulu. Sebanyak 10 gr akar tanaman dan tanah yang melekat dipermukaan akar dimasukkan dalam cawan petri kemudian di oven dengan suhu 80° C selama 1 jam. Tanah 10 gr tersebut disuspensikan pada 900 ml aquades dan kemudian di encerkan hingga 10⁻⁵ dan di *pour plate* pada

media *Nutrient Agar* (NA) kemudian diinkubasikan selama 48 jam. Koloni tunggal yang tumbuh dilakukan pemurnian serta karakterisasi (Khaeruni dkk., 2010). Isolat murni di lakukan pengujian Gram dan Hipersensitif sama dengan pengujian pada bakteri patogen.

Screening *Bacillus* spp., dan uji mekanisme penghambatannya

Screening ini dilakukan dengan metode dual plating untuk mengetahui mekanisme penghambatan antibiosis pada 24 isolat *Bacillus* spp. terhadap *Xcc* secara *in vitro*. Bakteri *Bacillus* spp, ditumbuhkan pada media YPGA dalam satu petri diletakkan 8 titik koloni dan diinkubasi selama 2 × 24 jam dengan suhu ruang. Petri dibalik pada bagian tutup ditetesi larutan klorofom 1 ml dan didiamkan selama 2 jam. Petri dibalik ke kembali dan pada permukaan medium tersebut dituangkan suspensi *Xcc* (0,2 ml suspensi *Xcc* dalam 4 ml 0,6 agar air pada suhu 45°C), kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30° C, dan diukur zona hambat pada 4 sisi dari tepi koloni *Bacillus* spp.

Rumus mengukur zona bening bakteri sebagai berikut,

$$X = \frac{x1+x2+x3+x4}{4}$$

Keterangan: X= Daya hambat x1= Sisi 1; x2= sisi 2; x3= sisi 3; x4= sisi 4

Zona hambatan yang terbentuk dan telah dilakukan pengukuran, maka dapat dikategorikan zona hambatan besar > 2 mm, zona hambatan sedang 2-2,5mm, dan zona hambatan kecil < 2 mm.

Cara untuk mengetahui mekanisme penghambatan, agar yang berada pada zona hambatan diambil secara aseptis dengan menggunakan *scalpel* steril dan kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 1% air pepton dan dihancurkan menggunakan jarum preparat. Air pepton yang berisi agar kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu 30°C. Air pepton yang tidak menjadi keruh terus dishaker selama lima hari dan jika tetap tidak keruh, maka mekanisme penghambatan bersifat bakterisidal (Arwiyanto, 1997).

Hasil Screening akan didapatkan bakteri terpilih kemudian dilakukan uji karakterisasi yang terdiri dari uji katalase, uji oksidase, dan uji hidrolisa pati. Metode uji hidrolisa pati memiliki kesamaan dengan pengujian pada bakteri patogen.

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui aktivitas katalase bakteri yang akan diuji. Uji ini dilakukan dengan meneteskan hydrogen peroksida

(H₂O₂) 3% pada gelas obyek yang bersih. Biakan dioleskan pada gelas obyek yang sudah ditetesi hydrogen peroksida dengan ose. Suspensi dicampur secara perlahan menggunakan ose, hasil yang positif ditandai oleh terbentuknya gelembung-gelembung (Dewi, 2013).

Uji oksidase ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang diuji memiliki sitokrom oksidase atau tidak, pengujian ini dilakukan dengan menggosokkan koloni bakteri berumur 24 jam pada kertas saring steril yang telah ditetesi dengan media berupa 1% larutan

tetramethylparaphenylenediamine dihydrochloride. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna bakteri pada kertas saring yang menjadi warna ungu gelap setelah 10 hingga 15 detik (Schaad *et al.*, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dilakukan dari tanaman yang menunjukkan gejala dengan bercak berwarna coklat yang disertai halo berwarna kuning. Hal ini sesuai dengan Starr *et al.*, (1977) Fahy and

Persley (1983) bahwa bakteri *Xanthomonas* memproduksi pigmen kuning pada koloninya yang disebut dengan Xanthomonadins. Isolat xanthomonas hasil isolasi memiliki sifat gram negatif (Tabel. 1).

Tabel 1. Karakterisasi *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Karakteristik	Hasil Isolat	Schaad (2001) <i>X. campestris</i>	Wahyudi (2011) <i>X. oryzae</i>
Uji Gram	-	-	-
Uji HR	+	nt	+
Uji Patogenesitas	+	nt	+
Uji Hidrolisa pati	+	+	-
Uji Sumber Karbon (Glukosa)	+	+	+

Keterangan: nt (not test)

Hal ini sesuai dengan Pratama dkk (2015), bahwa *Xanthomonas campestris* merupakan bakteri gram negatif. Bakteri tersebut bersifat patogen yang ditunjukkan dengan hasil uji hipersensitif, terjadi bercak nekrosis pada daun tembakau. Menurut Marryat (1907) dalam Leiwakabessi (2011) mengemukakan bahwa dengan adanya bercak nekrosis pada daun tembakau inang mengalami kematian. Patogen telah menyerap seluruh nutrisi inang sehingga tidak dapat melanjutkan metabolismenya. Uji patogenesitas menunjukkan bahwa isolat bakteri patogen bersifat virulen terhadap inang, dengan munculnya gejala berwarna kuning pada tepi daun, maka bakteri patogen tersebut merupakan Xcc karena dapat menimbulkan gejala pada tanaman inangnya. Gejala ini sesuai dengan Alvares *et al* (1994) dalam Lumory dkk (tanpa tahun) bahwa gejala yang ditimbulkan oleh bakteri patogen busuk hitam pada kubis, dengan munculnya gejala yang membentuk huruf V diikuti oleh nekrosis yang disebabkan oleh *Xanthomonas sp.* Induksi reaksi hipersensitif dan patogenesitas dipengaruhi oleh gen *hrp* yang umum ditemukan pada bakteri gram negatif, termasuk kelompok *Xanthomonas sp* (Wahyudi dkk, 2015).

Isolat Xcc tersebut mempunyai kemampuan dalam menghidrolisa senyawa pati dan memanfaatkannya sebagai sumber karbon. Hal tersebut menandakan bahwa koloni bakteri mampu menghidrolisa makromolekul polisakarida dengan menggunakan enzim amilase. Luas daerah hidrolisis akan semakin meningkat seiring dengan

bertambahnya waktu masa inkubasi (Sopyan, 2009). Kemampuan tersebut berperan dalam proses patogenesis, bakteri tersebut akan merombak senyawa pati hasil fotosintesis menjadi gula sederhana yang dimanfaatkan sebagai sumber energi dalam metabolismenya.

Berdasarkan hasil isolasi *Bacillus* didapatkan sebanyak 24 isolat. Hal ini berdasarkan hasil pengujian gram positif dan hipersensitif negatif yang sama ada ke 24 isolat tersebut. Kemudian dilakukan uji penghambatan terhadap Xcc, dan terdapat 12 isolat yang mampu membentuk zona hambatan. Isolat yang mampu membentuk zona hambatan dimasukkan dalam kategori dan pada masing-masing kategori dimbi 2 sebagai perwakilan untuk uji pada tahap selanjutnya (gambar 1).



Gambar 1. Zona hambatan *Bacillus* spp., terhadap *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Senyawa antimikroba yang dikeluarkan dipengaruhi oleh spesies dari bakteri Genus *Bacillus* tersebut. Menurut Nishijima *et al.* (2005) dalam Khadim (Tanpa Tahun) mengemukakan bahwa, spesies *Bacillus* dapat

menghasilkan sedikitnya terdapat 66 jenis antibiotik dan strain tertentu yang merupakan agen biokontrol.

Isolat terpilih memiliki kemampuan penghambatan terhadap Xcc yang berbeda-bedar. Hal tersebut sesuai dengan Arwiyanto (1997) menyatakan bahwa perbedaan zona hambat tersebut diduga bahwa koloni yang digunakan memiliki perbedaan dalam melakukan sekresi pengendalian terhadap koloni patogen.

Berdasarkan uji penghambatan terhadap Xcc, sejumlah enam isolat *Bacillus* terpilih dilakukan karakterisasi

dengan beberapa uji. Keenam isolat mempunyai karakteristik yang sama. Uji katalase yang positif dengan ditunjukkan dengan adanya gelembung. Uji oksidase positif, dengan perubahan warna isolat menjadi ungu dan hidrolisa pati positif dengan munculnya zona putih pada sekitar koloni. Mekanisme penghambatan bersifat bakteristatik dengan berubahnya suspensi bakteri menjadi keruh. Hasil uji disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Karakterisasi *Bacillus* spp

Karakteristik	Hasil Karakteristik Isolat						Robert (1994) <i>B. subtilis</i> RO-SS-1	Saputra (2015) <i>B. licheniformis</i>
	K11	K13	K21	K28	N2	N3		
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisa Pati	+	+	+	+	+	+	+	+
Mekanisme Penghambatan:								
a. Bakteristatik	+	+	+	+	+	+	Nt	nt
b. Bakterisidal								

Keterangan: nt (not test)

Sejumlah enam isolat terpilih (Tabel.3) pada uji oksidase menunjukkan *Bacillus* spp., memiliki enzim peroksidase, hal ini sesuai dengan Dwijoesepuro (1990) bahwa *Bacillus* memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim peroksidase . Enzim peroksidase berperan untuk mengubah hidrogen peroksida (H₂O₂) yang beracun bagi bakteri itu sendiri menjadi oksigen. Perubahan warna isolat menjadi ungu menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* tersebut memiliki sitokrom c. Hal ini sesuai dengan Fahy dan Persley (1983), bahwa *Bacillus*

memiliki sitokrom c. Sitokrom yang merupakan gugus hemoprotein yang mengandung gugus heme yang digunakan sebagai transfer elektron. *Bacillus* dapat menghidrolisa pati dengan adanya zona putih pada sekitar koloni bakteri. Berdasarkan hal tersebut *Bacillus* memiliki enzim amilase untuk memecah pati menjadi molekul glukosa sehingga dapat diserap oleh sel bakteri dan digunakan untuk proses metabolisme. Hal ini sesuai dengan Sopyan (2009) bahwa hasil hidrolisa pati digunakan sebagai sumber karbon untuk proses metabolismenya.

Bacillus spp., menghambat Xcc dengan mekanisme bakteriostatik. Senyawa antimikroba dalam konsentrasi yang rendah tidak dapat membunuh patogen akan tetapi dalam konsentrasi yang tinggi dapat membunuh patogen.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat disimpulkan bahwa *Bacillus* spp yang

Hal ini sesuai dengan Waluyo (2010) menyatakan bahwa bahan anti mikrobial dapat bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah, dan dapat bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi.

diisolasi memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghambat Xcc, dan memiliki sifat yang sama dalam karakternya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z, L Aini, A Abadi. 2015. Pengaruh Bakteri *Bacillus* sp, Dan *Pseudomonas* sp. Terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. Penyebab Penyakit Rebah Semai Pada Tanaman Kedelai. HPT, 3(1):2338-4336.
- Ajilgba C, O O Babalola, And F Ahmad. 2013. Antagonistic Effect of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tommato *Fusarium* Wilt. *Ethno Med*, 7(3):205-216.
- Arwiyanto, T. 1997. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Bakteri Tembakau : 1. Isolasi Bakteri Antagonis. *Perlindungan Tanaman Indonesia*, 3(1):54-60.
- Badan Pusat Statistika dan Direktorat Jenderal Hortikultura. 2017 *Produksi Kubis Menurut Provinsi Jawa Timur*. Jawa Timur: BPSDJH.
- Dewi A. 2013. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap *Amoxicillin* dari sampel susu kambing peranakan ettawa (PE) penderita mastitis di wilayah girimulyo, kulonprogo, Yogyakarta. *Sain Veteriner*, 31(2):138-150.
- Dwijoesepuro. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Malang ; 73, 74.
- Fahy. P.C. and Persley G.J. 1983. *Plant Bacterial Diseases a Diagnostic Guide*. Australian. Academic Press.
- Handoko A, A Abadi, dan L Aini. 2014. Karakterisasi penyakit penting pada pembibitan tanaman durian di desa plangkronan, kabupaten magetan dan pengendalian dengan bakteri antagonis secara *in vitro*. *HPT*, 2(2):15-22.
- Khaeruni A, dan Hs Gusnawaty. 2012. Penggunaan *Bacillus* spp. sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan penyakit layu fusarium pada tanaman cabai. *Agroteknos*, 2(3):182-189.
- Khadim M, P A Mihardjo, A Majid. (tanpa tahun). Efektivitas Beberapa Isolat *Bacillus* spp Untuk Mengendalikan Jamur *Rhizoctonia solani* Pada Tanaman Kedelai. Tanpa penerbit, tanpa nomer, tanpa volume: 1-6.
- Leiwakabessy, C. 2011. Kajian Hipersensitif. Deoartemen Proteksi Tanaman, Program Studi Fitopatologi, ITB.

- Lumoly, F, S Emmy, M Guntur. Tanpa tahun. Inidensi Penyakit Busuk Hitam Pada Tanaman Brokoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) Di Tomohon. Universitas Sam Ratulangi-Manado.
- Mujib A, M Syabana, dan D Hasturi. 2014. Uji efektifitas larutan pestisida nabati terhadap hama ulat krop (*Crocidolomia pavonana* L.) pada tanaman kubis (*Brassica oleraceae*). Ilmu Perikanan dan Perikanan, 3(1):67-72.
- Panjaitan D, I Suada, dan M Sritamin. 2014. Uji keefektifan ekstrak beberapa biji tanaman untuk menghambat pertumbuhan bakteri bercak daun (*Xanthomonas campestris*) pada tanaman tomat. *Agroekoteknologi Tropika*, 3(2):89-96.
- Prataman R, Yuliani, G Trimulyono. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun dan Biji Jarak (*Jatropha curcas*) sebagai Antibakteri *Xanthomonas campestris* Penyebab Penyakit Busuk Hitam Pada Tanaman Kubis. *LenteraBio*, 4(1):112-118.
- Prihatiningsih N, H Djatmiko, dan Hermianto. 2010. Potensi *Bacillus* spp. B46 dan *Sterptomyces* spp. S4 sebagai agens pengendali penyebab penyakit lincat pada tembakau. *Agronomika*, 10(1):43-55.
- Rahayuniati R F dan E Mugiastuti. 2012. Kefektifan *Bacillus* sp. Dan *Pseudomonas fluorescense* Mengendalikan *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici Dan *Meloidogyne* sp. Penyebab Penyakit Layu Pada Tomat Secara In Vitro, Fakultas Pertanian Universitas Jendral Soedirman.
- Schaad NW, JB Jones and W Chun. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. USA; Onacid. Pg: 175-193.
- Sopyan A. 2009.[Skripsi]. Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Isolat-Isolat *Bacillus* spp Penghasil Bakteriosin Asal Hutan Wana Wisata Cangkuang. Departemen Biologi, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. ITB. Bogor.
- Waluyo L. 2010. Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi. Malang: UMM Press.