

## KARAKTERISASI BAKTERI DARI PERAKARAN *Nepenthes mirabilis* UNTUK PENGENDALIAN HAYATI *Fusarium oxysporum*

### *Characterization of Rhizobacteria from Roots of Nepenthes mirabilis as Biological Control Agents against Fusarium oxysporum*

Mardhiana<sup>1)</sup>, Muh Adiwena<sup>1)</sup>, dan Ankardiansyah Pandu Pradana<sup>2\*)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Borneo Tarakan  
Jalan Amal Lama No. 1, Tarakan Timur, Tarakan, Kalimantan Utara

<sup>2)</sup>Program Studi Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Jember  
Jalan Kalimantan No. 37, Krajan Timur, Sumbersari, Jember, Jawa Timur

#### INFO ARTIKEL

**Article history:**  
Diterima: 05 Desember 2019  
Direvisi: 24 Februari 2020  
Disetujui: 30 April 2020

**Kata kunci:**  
Biokontrol; enzim ekstra-  
seluler; fenotip; fisiologi;  
HCN

**Keywords:**  
Biocontrol; extracellular  
enzymes, phenotypes,  
physiology, HCN

#### ABSTRAK/ABSTRACT

Cendawan patogen *Fusarium oxysporum* dapat mengakibatkan kerugian besar pada berbagai tanaman rempah. *Fusarium oxysporum* dilaporkan dapat dikendalikan dengan bakteri antagonis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter fisiologi dan antagonis bakteri dari perakaran *Nepenthes mirabilis*, sebagai pengendali hayati *F. oxysporum*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Borneo, Tarakan, sejak Oktober sampai November 2017. Medium *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk mengisolasi bakteri antagonis dari akar *N. mirabilis*. Pengujian keamanan hayati terhadap tanaman dan mamalia dilakukan menggunakan uji hipersensitif dan uji hemolisis. Isolat bakteri yang aman kemudian dikarakterisasi fenotip dan sifat fisiologisnya serta diuji kemampuannya dalam menghambat *F. oxysporum* secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 10 dari 26 isolat bakteri dari akar *N. mirabilis* yang aman bagi tanaman dan mamalia. Uji fisiologis menunjukkan empat isolat dapat menghasilkan enzim proteolitik, lima isolat menghasilkan enzim kitinolitik, enam isolat mampu melarutkan fosfat, dan empat isolat dapat memproduksi HCN. Sebanyak 3 isolat (Mrb2, Mrb6, dan Mrb16) menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *F. oxysporum* secara *in vitro*.

*Phytopathogenic fungi Fusarium oxysporum causes significant yield losses in various spices plants. The fungus can be controlled with numerous types of antagonistic bacteria. This study aimed to determine the physiological characteristic and antagonistic properties of the bacterial from the roots of Nepenthes mirabilis, as a biological control to F. oxysporum. The study was conducted at the Plant Protection Laboratory, Faculty of Agriculture, the University of Borneo, Tarakan, from October to November 2017. Nutrient Agar medium was used to isolate antagonistic bacteria from the roots of N. mirabilis. Biosafety test against plants and mammals were conducted using hypersensitive and hemolysis analysis. The bacterial isolates passed from those tests were characterized further for their phenotype and physiological properties as well as their ability to inhibit the growth of F. oxysporum in a dual culture test in vitro. The results showed that there were 10 out of*

\* Alamat Korespondensi : [pandu@unej.ac.id](mailto:pandu@unej.ac.id)

---

26 bacterial isolates originated from *N. mirabilis* roots that were safe for plants and mammals. Physiological tests showed that four isolates could produce the proteolytic enzyme, five isolates produced the chitinolytic enzyme, six isolates were able to dissolve phosphate, and four isolates could produce HCN. Furthermore, three isolates (Mrb2, Mrb6, and Mrb16) showed inhibitory activity against *Fusarium* spp. There were differences in the phenotype character and physiological activity between the Mrb2, Mrb6, and Mrb16 isolates, but all three have the potential to inhibit *F. oxysporum*.

---

## PENDAHULUAN

Cendawan fitopatogen *Fusarium* spp. memiliki sifat polifag dan dapat menyebabkan kerugian yang besar. Patogen ini mampu menginfeksi tanaman hortikultura, pangan, perkebunan, dan tanaman rempah. Tanaman lada yang terinfeksi oleh cendawan *Fusarium* spp. yang bersinergi dengan nematoda *Meloidogyne* spp. dan *Radopholus* spp. akan menunjukkan gejala penyakit kuning (Daras dan Pranowo 2017). Penyakit kuning pada tanaman lada cukup sulit dikendalikan secara konvensional karena inokulum patogen berada di bawah tanah, dan patogen dapat membentuk inokulum sekunder di lapangan (Munif dan Sulistiawati 2014). Tanaman rempah lainnya yang dapat terinfeksi oleh *Fusarium* spp. adalah jahe. Penyakit busuk rimpang jahe yang diakibatkan oleh *F. oxysporum* Schlecht f.sp. *zingiberi* Trujillo merupakan salah satu kendala terbesar dalam budidaya jahe (Li *et al.* 2014). Patogen ini dilaporkan menghambat budidaya jahe di berbagai daerah di Jawa Tengah (Prabowo *et al.* 2006).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mengurangi kerugian akibat infeksi *Fusarium* spp. pada tanaman rempah adalah mengendalikan jumlah inokulum *Fusarium* spp. menggunakan agens pengendali hayati (Fravel *et al.* 2003). Efektivitas agens hayati dari golongan bakteri dalam mengendalikan populasi cendawan fitopatogen telah banyak dilaporkan sebelumnya (Larkin dan Fravel 1998; Zhao *et al.* 2011). Eksplorasi dan isolasi agens hayati, terutama dari golongan bakteri seringkali dilakukan dari bagian perakaran tanaman. Agens hayati dapat berasal dari spesies tanaman yang sama maupun berbeda (Ma *et al.* 2011). Pradana *et al.* (2015) melaporkan bakteri antagonis yang diisolasi dari perakaran *Rhoeo discolor* efektif menekan *Fusarium* spp.

yang diisolasi dari tanaman tomat. Menurut Tariq *et al.* (2017) bakteri antagonis dapat diisolasi dari tanaman dengan kriteria sehat dan memiliki ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik yang baik.

Berdasarkan kriteria di atas, salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai sumber agens antagonis adalah *Nepenthes mirabilis*. Tumbuhan tersebut banyak ditemui pada lahan yang kurang subur di Kalimantan Utara (Ilma *et al.* 2014). Tumbuhan *N. mirabilis* relatif sehat atau jarang ditemui dalam keadaan terinfeksi patogen. Kemampuannya bertahan pada lingkungan yang kurang menguntungkan, diduga ada kaitannya dengan bakteri yang bersimbiosis dengannya. Pada studi sebelumnya, Bhole *et al.* (2013) mengisolasi bakteri endofit dari *Nepenthes* spp., dan menemukan 55,2 % bakteri yang berasosiasi dengan *Nepenthes* spp. berasal dari genus *Bacillus*. Selanjutnya, pada studi lainnya, Li *et al.* (2012) berhasil mengisolasi 25 isolat bakteri dari *N. mirabilis* dan melaporkan bahwa bakteri asal *N. mirabilis* mampu memproduksi enzim protease. Tujuan penelitian adalah mengkarakterisasi bakteri dari perakaran *N. mirabilis*, khususnya karakter fisiologi dan kemampuan antagonisnya terhadap *F. oxysporum*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan lokasi penelitian

Sampel *N. mirabilis* diambil dari Hutan Penelitian Kota Tarakan (Kalimantan Utara, Indonesia). Selanjutnya, isolasi bakteri dan pengujian *in vitro* dilakukan di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Universitas Borneo Tarakan, Indonesia. Penelitian dilaksanakan sejak Oktober sampai November 2017.

### Isolasi bakteri asal akar *N. mirabilis*

Bakteri diisolasi dari bagian akar *N. mirabilis* yang tumbuh di Hutan Penelitian Kota Tarakan mengikuti metode yang dideskripsikan oleh Pradana *et al.* (2015) yang telah dimodifikasi (tanpa sterilisasi permukaan). Sampel akar dibilas dengan hati-hati menggunakan akuades steril untuk membersihkan partikel-partikel tanah yang menempel. Selanjutnya, sampel dikeringkan menggunakan kertas tisu steril.

Sebanyak 1 g sampel dimaserasi menggunakan mortar steril dengan penambahan akuades steril 1:10 (w/v). Medium *Nutrient Agar* (NA) 20 % dibuat dengan melarutkan 1,6 g medium *Nutrient Broth* (NB) (Merck, Jerman) dan 18 g agar-agar bakto ke dalam 1.000 ml akuades. Sebanyak 0,1 ml suspensi hasil maserasi kemudian diratakan pada medium *Nutrient Agar* (NA) 20 % lalu diinkubasi selama 72 jam pada suhu 27 °C. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan pada medium *Nutrient Agar* (NA). Koloni bakteri yang telah dimurnikan kemudian digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Isolat bakteri yang diperoleh disimpan di dalam *tube endorff* pada medium *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 40 % gliserol, dan disimpan pada suhu 4 °C sampai digunakan untuk uji selanjutnya (Munif *et al.* 2012).

### Pengujian reaksi hipersensitif

Isolat bakteri yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* (NA), dan diinkubasi selama 48 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dipanen menggunakan 2 ml akuades steril. Sebanyak 250 µl suspensi yang terbentuk kemudian diinfiltrasikan ke bagian bawah lamina daun tembakau menggunakan *disposable syringe* ukuran 1 ml tanpa menggunakan jarum. Daun tembakau kemudian diinkubasi selama 48 jam. Tanaman tembakau yang digunakan adalah varietas Kemloko 3, berumur 3 bulan, dan daun yang digunakan untuk pengujian reaksi hipersensitif adalah daun ke-4 sampai dengan ke-6 dari atas. Isolat yang menyebabkan nekrosis pada daun tembakau dalam waktu 48 jam tidak digunakan pada pengujian selanjutnya karena berpotensi sebagai patogen tanaman (Klement dan Goodman 1967).

### Pengujian aktifitas hemolisis

Isolat bakteri yang tidak menyebabkan reaksi hipersensitif pada pengujian sebelumnya digunakan pada pengujian ini. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Blood Agar* (BA) dan diinkubasi selama 48 jam.

Bakteri yang menghasilkan toksin  $\alpha$ -hemolisis akan membentuk zona gelap, yang menghasilkan toksin  $\beta$ -hemolisis akan membentuk zona terang, dan yang menghasilkan toksin  $\alpha\beta$ -hemolisis akan membentuk zona terang diikuti agak gelap di sekitar koloni (Payment *et al.* 1994). Isolat yang memproduksi toksin  $\alpha$ -hemolisis,  $\beta$ -hemolisis, dan  $\alpha\beta$ -hemolisis akan didestruksi, dan isolat yang tidak memproduksi toksin hemolisis akan digunakan pada pengujian selanjutnya.

### Karakterisasi fenotip koloni bakteri

Isolat bakteri yang tidak menimbulkan reaksi hipersensitif dan tidak memproduksi toksin hemolisis kemudian diamati karakter fenotipnya. Karakter yang diamati adalah bentuk koloni, ukuran, tekstur, warna, dan elevasi (Munif *et al.* 2012).

### Karakterisasi Gram menggunakan KOH

Koloni bakteri diletakkan di atas gelas objek yang telah diberi 1-2 tetes larutan KOH 3 % dengan menggunakan lup inokulasi. Isolat bakteri dicampur dengan KOH 3 % hingga merata. Reaksi Gram negatif (-) ditunjukkan dengan adanya lendir yang ikut terangkat pada lup inokulasi (Gregersen 1978).

### Sumber isolat *Fusarium oxysporum*

Isolat *F. oxysporum* diisolasi dari perakaran tanaman tomat yang menunjukkan gejala layu. Sebanyak 1 g akar tanaman tomat dibersihkan dengan air, lalu digerus menggunakan 10 ml akuades steril. Suspensi yang terbentuk diencerkan sampai pengenceran  $10^{-4}$ . Suspensi hasil pengenceran kemudian diambil 0,1 ml untuk dikulturkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Cendawan yang tumbuh kemudian dimurnikan dan dikarakterisasi berdasarkan bentuk makrokonidianya. Isolat yang memiliki karakter

*F. oxysporum* dikonfirmasi sifat patogeniknya melalui metode *Postulat Koch*. Isolat cendawan yang terkonfirmasi sebagai *F. oxysporum* kemudian dikulturkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan metode agar miring di tabung reaksi, dan disimpan pada suhu 4 °C (Nugraheni 2010).

### Uji kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. secara *in vitro*

Pengujian dilakukan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan metode *dual culture*. Isolat bakteri ditumbuhkan pada bagian tengah cawan petri, kemudian cendawan *F. oxysporum* ditumbuhkan pada ¼ bagian dari cawan petri yang sama. Jari-jari pertumbuhan *F. oxysporum* yang tumbuh ke arah bakteri dan ke arah yang berlawanan dengan bakteri diukur pada hari ke-5 setelah pengujian dilakukan. Sebagai kontrol, cendawan *F. oxysporum* ditumbuhkan pada cawan petri yang bagian tengahnya diolesi akuades steril. Hasil pengukuran kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$P = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \%$$

Keterangan/Note :

- P : persentase penghambatan pertumbuhan (%) / *Percentage of growth retardation (%)*.
  - R1 : jarak jari-jari miselium hingga tepi cawan petri (cm) / *Mycelium radius distance to the edge of the petridish (cm)*.
  - R2 : jarak jari-jari miselium hingga tepi zona hambat (cm) / *Mycelium radius distance to the edge of the inhibition zone (cm)*.
- Sumber : Pradana *et al.* 2015.

### Karakterisasi sifat fisiologis bakteri

Aktivitas proteolitik diuji pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) yang terdiri atas 10 g susu skim pada 500 ml medium *Natrium Agar* (NA). Isolat bakteri digores pada media *Skim Milk Agar* (SMA) kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27 °C. Aktivitas proteolitik ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah 48 jam pengujian (Sessitsch *et al.* 2004).

Aktivitas kitinolitik diuji pada medium *Kitin Agar* yang terdiri atas 15 g agar-agar bakto; 5 g glukosa; 2 g pepton; 10 g koloidal kitin; 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g NaCl dalam 1 s akuades. Isolat bakteri digores pada media uji dan

diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27 °C. Aktivitas kitinolitik ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah 5 hari pengujian (Quecine *et al.* 2008).

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan senyawa volatil HCN diuji menggunakan medium spesifik yaitu *Nutrient Agar* (NA) yang telah ditambahkan dengan 4,4 g glisin. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media dan diinkubasi selama 7 hari. Pada bagian tutup cawan petri ditempeli kertas saring yang telah direndam menggunakan *Cyanide Detection Solution* (CDS) yang tersusun atas 8 g sodium karbonat di dalam 200 ml akuades steril. Perubahan warna kertas saring dari kuning menjadi jingga atau kecokelatan menunjukkan bakteri mampu memproduksi senyawa HCN (Lorck 1948).

Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat diuji pada medium *Pikovskaya Agar* (Himedia, India). Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium uji dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27 °C. Aktifitas melarutkan fosfat ditunjukkan dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah 5 hari pengujian (Sharma *et al.* 2011).

### Analisis data

Data dianalisis secara deskriptif dengan menjelaskan hasil dari setiap pengujian yang dilakukan dalam bentuk tabel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan uji keamanan hayati

Sebanyak 26 isolat bakteri berhasil diisolasi dan dimurnikan. Berdasarkan hasil penelitian diketahui sebanyak 14 isolat mampu menyebabkan reaksi hipersensitif. Reaksi hipersensitif ditandai dengan munculnya nekrosis pada daun tanaman tembakau yang diinfiltrasi menggunakan isolat yang diuji. Selanjutnya, pengujian aktivitas hemolisis yang menunjukkan 1 isolat mampu menghasilkan toksin α hemolisis, dan 1 isolat lainnya mampu menghasilkan toksin β hemolisis. Dari 26 isolat yang diuji, terdapat 16 isolat yang tidak dapat digunakan pada pengujian selanjutnya karena memiliki potensi sebagai patogen bagi tumbuhan dan manusia. Pada

pengujian selanjutnya hanya digunakan 10 isolat bakteri yang aman, yaitu isolat Mrb2, Mrb3, Mrb4, Mrb6, Mrb8, Mrb9, Mrb15, Mrb16, Mrb18 dan Mrb21 (Tabel 1).

Reaksi hipersensitif (HR) merupakan salah satu mekanisme pertahanan tanaman dalam melokalisir penyebaran patogen (Klement dan Goodman 1967). Secara umum terdapat 3 tahapan

yang terjadi pada mekanisme Reaksi hipersensitif (HR): (1) fase induksi, (2) fase laten, dan (3) fase kolaps. Gen Avr diantarkan kedalam sel inang dengan mekanisme sekresi khusus sehingga menyebabkan rusaknya membran sel tengah dari tanaman. Mekanisme ini menyebabkan sel inang pada daerah yang terinokulasi patogen mengalami kolaps dan mengering (nekrosis) (Balint-Kurti 2019). Isolat bakteri yang menyebabkan reaksi hipersensitif tidak dapat digunakan sebagai agens hayati karena berpotensi memiliki sifat patogenik yang dapat membahayakan tanaman dan menyebabkan kerusakan ekosistem.

Hemolisis merupakan fenomena rusaknya jaringan darah akibat lepasnya haemoglobin dari stroma eritrosit (butir darah merah). Fenomena hemolisis dapat dipicu oleh beberapa faktor seperti adanya pelarut organik, saponin, garam empedu, sabun, enzim, toksin, dan faktor-faktor lainnya yang dapat merusak komplek lemak-protein dari stroma. Terdapat 3 jenis hemolisis yang dapat disebabkan oleh bakteri, yaitu  $\beta$ -hemolisis dan  $\alpha$ -hemolisis.  $\beta$ -hemolisis merupakan lisis lengkap sel darah merah dan haemoglobin, sedangkan  $\alpha$ -hemolisis merupakan lisis parsial atau lisis sebagian dari sel darah merah dan haemoglobin. Bakteri yang mampu menghasilkan toksin hemolisin berpotensi membahayakan kesehatan manusia karena dapat merusak sel darah merah (Guillaud *et al.* 2012).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mardhiana *et al.* (2017) yang mengisolasi bakteri endofit dari akar *Cyperus rotundus* juga ditemui beberapa isolat yang mampu menyebabkan reaksi hipersensitif dan memproduksi toksin hemolisin. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Wiratno *et al.* (2019) yang mengisolasi bakteri endofit dari akar *P. nigrum* juga terdapat beberapa isolat yang menyebabkan reaksi hipersensitif dan memproduksi toksin hemolisin. Pada kedua studi tersebut, isolat yang berpotensi sebagai patogen tumbuhan dan membahayakan manusia tidak digunakan pada pengujian selanjutnya.

**Karakter morfologi dan Gram isolat bakteri**

Dari 10 isolat bakteri yang aman digunakan sebagai agens hayati, seluruhnya

Tabel 1. Hasil pengujian reaksi hipersensitif dan aktivitas hemolisis isolat bakteri asal akar *N. mirabilis*.  
 Table 1. Test results for hypersensitivity reactions and hemolysis activity of bacterial isolates from roots of *N. mirabilis*.

Isolat	Uji reaksi hipersensitif	Uji aktivitas hemolisis
Mrb1	+	x
Mrb2	-	-
Mrb3	-	-
Mrb4	-	-
Mrb5	-	$\beta$
Mrb6	-	-
Mrb7	+	x
Mrb8	-	-
Mrb9	-	-
Mrb10	+	x
Mrb11	+	x
Mrb12	+	x
Mrb13	+	x
Mrb14	+	x
Mrb15	-	-
Mrb16	-	-
Mrb17	+	x
Mrb18	-	-
Mrb19	-	$\alpha$
Mrb20	+	x
Mrb21	-	-
Mrb22	+	x
Mrb23	+	x
Mrb24	+	x
Mrb25	+	x
Mrb26	+	x

**Keterangan/Note :**

- + : Menyebabkan nekrotik pada daun tanaman tembakau/*Caused necrotic on tobacco leaves.*
- : Tidak menyebabkan gejala nekrotik atau tidak memproduksi toksin hemolisis/*Did not cause necrotic on tobacco leaves or did not produce hemolysis toxins.*
- $\alpha$  : Mampu memproduksi toksin  $\alpha$ -hemolisis/*Able to produce  $\alpha$ -hemolysis toxins.*
- $\beta$  : Mampu memproduksi toksin  $\beta$ -hemolisis/*Able to produce  $\beta$ -hemolysis toxins.*
- x : Tidak diuji karena menimbulkan reaksi hipersensitif pada pengujian sebelumnya/*not tested due a hypersensitive reaction*

memiliki karakter fenotip yang berbeda. Sebanyak 9 isolat memiliki warna dasar putih, dan 1 isolat lainnya memiliki warna dasar cokelat. Berdasarkan bentuknya, 6 isolat memiliki bentuk *irregular*, 3 isolat memiliki bentuk *circular*, dan 1 lainnya memiliki bentuk *spindle*. Berdasarkan pengamatan elevasi koloni, diketahui 1 isolat memiliki elevasi *flat*, 4 isolat berelevasi *convex*, 1 isolat berelevasi *pulvinate*, dan 4 isolat berelevasi *raised*. Sebagian besar isolat bakteri memiliki karakter tepian koloni *entire* (7 isolat), dan 3 lainnya memiliki karakter tepian koloni *undulate*. Ukuran koloni bakteri yang diamati cukup beragam, 2 isolat memiliki ukuran *punctiform*, 3 isolat berukuran *small*, 5 isolat berukuran *moderate*. Lebih lanjut, sebanyak 3 isolat teridentifikasi memiliki gram negatif, dan 7 lainnya memiliki gram positif (Tabel 2).

Karakter fenotip merupakan hasil interaksi dari karakter genotip dengan lingkungan. Gen-gen penyusun karakter fenotip akan aktif pada kondisi lingkungan yang cocok. Munif *et al.* (2019) mengisolasi bakteri endofit dari tanaman kehutanan, sebagian besar isolat yang diperoleh memiliki karakter fenotip yang berbeda. Keragaman karakter fenotip bakteri endofit telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari perakaran tanaman mangrove yang dilaporkan Oktafiyanto *et al.* (2018). Kedua hasil penelitian tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini yang memperoleh isolat bakteri dengan karakter yang berbeda-beda.

### Aktifitas antagonisme bakteri terhadap *Fusarium oxysporum*

Dari 10 isolat bakteri yang diuji, 3 diantaranya mampu menghambat pertumbuhan

*F. oxysporum* secara *in vitro*. Penghambatan tertinggi ditunjukkan berturut-turut oleh isolat Mrb16 (67 %), Mrb6 (60 %), dan Mrb2 (5 %) (Gambar 1). Selain ketiga isolat tersebut, isolat lainnya tidak menunjukkan aktifitas penghambatan *F. oxysporum*. secara *in vitro* (Tabel 3).

Agens hayati dari golongan bakteri dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan patogen melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah mekanisme antibiosis. Antibiosis merupakan mekanisme antagonis oleh agens hayati dengan memproduksi metabolit sekunder berupa antibiotik atau senyawa metabolit sekunder yang mirip antibiotik seperti enzim lisis, senyawa volatil, *siderofor*, atau senyawa lainnya (Haggag

Tabel 3. Kemampuan bakteri asal akar *N. mirabilis* dalam menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro*.

Table 3. The ability of bacteria from roots of *N. mirabilis* in inhibiting the growth of *F. oxysporum* *in vitro*.

Isolat	Penghambatan pertumbuhan (%)
Mrb2	5
Mrb3	-
Mrb4	-
Mrb6	60
Mrb8	-
Mrb9	-
Mrb15	-
Mrb16	67
Mrb18	-
Mrb21	-

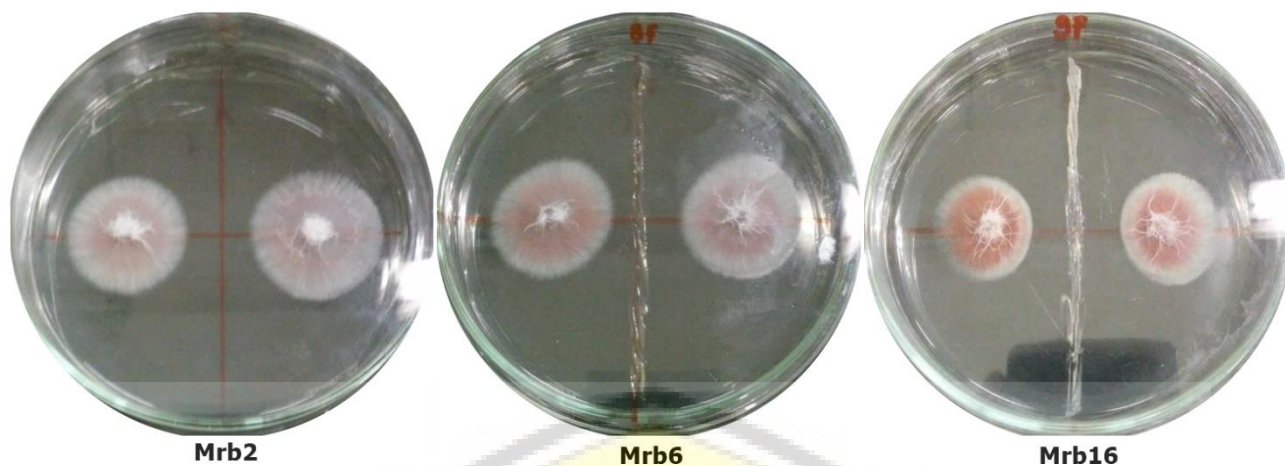
Keterangan/Note :

- = Tidak mampu menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp./Did not inhibit the growth of *Fusarium* spp.

Tabel 2. Karakter fenotip dan Gram bakteri antagonis asal perakaran tanaman *N. mirabilis*.

Table 2. Phenotypic and Gram character of antagonistic bacteria from roots of *N. mirabilis*.

Isolat	Warna	Bentuk	Elevasi	Tepian	Ukuran	Gram
Mrb2	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	<i>Moderate</i>	-
Mrb3	Cokelat muda	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Punctiform</i>	+
Mrb4	Putih kecokelatan	<i>Irregular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Undulate</i>	<i>Small</i>	+
Mrb6	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Moderate</i>	-
Mrb8	Putih cerah	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Moderate</i>	+
Mrb9	Putih transparan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Punctiform</i>	+
Mrb15	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Undulate</i>	<i>Moderate</i>	+
Mrb16	Putih	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	+
Mrb18	Putih kekuningan	<i>Spindle</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Moderate</i>	+
Mrb21	Putih kemerahan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	-



Gambar 1. Hasil uji antagonis bakteri asal akar *N. mirabilis* dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. secara *in vitro*.

Figure 1. The antagonistic test result of bacteria from roots of *N. mirabilis* in inhibiting the growth of *Fusarium* spp. *in vitro*.

dan Mohamed 2007; Prihatiningsih *et al.* 2015). Antibiotik merupakan senyawa organik dengan berat molekul rendah yang dihasilkan sebagai metabolit sekunder dan bersifat menghambat mikroorganisme lainnya dalam konsentrasi yang rendah (Walsh dan Wencewicz 2014). Prihatiningsih *et al.* (2015) melaporkan bakteri *Bacillus subtilis* strain B315 mampu menghasilkan senyawa antibiosis dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*. Umumnya, mekanisme antibiosis ditunjukkan dengan munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri yang memiliki kemampuan antibiosis. Tanda lainnya adalah dengan terhambatnya pertumbuhan suatu patogen ke arah agens hayati yang memproduksi senyawa antibiosis (Prihatiningsih *et al.* 2015).

Mekanisme antibiosis oleh bakteri asal perakaran tanaman telah dilaporkan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Pradana *et al.* (2015) berhasil mengisolasi 21 isolat bakteri asal perakaran tanaman *Rhoeo discolor* dan 7 isolat diantaranya mampu menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro* melalui mekanisme antibiosis. Wiratno *et al.* (2019) yang mengisolasi bakteri endofit asal akar tanaman lada juga melaporkan beberapa isolat bakteri yang berhasil diisolasi efektif menekan pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro* melalui mekanisme

antibiosis. Hasil penelitian Pradana *et al.* (2015) dan Wiratno *et al.* (2019) di atas selaras dengan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, yaitu beberapa bakteri asal perakaran tumbuhan dapat menghambat pertumbuhan patogen melalui mekanisme antibiosis.

#### Aktifitas fisiologi bakteri asal perakaran *N. mirabilis*

Hasil pengujian aktifitas fisiologi menunjukkan terdapat 4 isolat yang memiliki aktifitas proteolitik, 5 isolat memiliki aktifitas kitinolitik, 6 isolat mampu melarutkan fosfat, dan 4 isolat mampu memproduksi senyawa volatil HCN (Tabel 4).

Isolat bakteri dinyatakan memiliki aktifitas proteolitik apabila mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler. Enzim protease atau sering disebut proteinase adalah enzim golongan hidrolase yang mampu memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana seperti oligo peptide pendek atau asam amino (Das dan Prasad 2010). Isolat bakteri dinyatakan memiliki aktifitas kitinolitik apabila mampu memproduksi enzim kitinase ekstraseluler. Kitinase adalah enzim yang akan mengkatalisis pemecahan senyawa polimer kitin pada ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4. Enzim kitinase

Tabel 4. Aktifitas fisiologi bakteri antagonis asal perakaran *N. mirabilis*.  
Table 4. Physiological activities of antagonistic bacteria from *N. mirabilis* roots.

Kode Isolat	Proteolitik	Kitinolitik	Melarutkan Fosfat	Produksi HCN
Mrb2	-	+	-	-
Mrb3	-	+	-	-
Mrb4	-	+	+	+
Mrb6	+	+	+	-
Mrb8	-	-	+	-
Mrb9	+	-	-	+
Mrb15	+	-	-	-
Mrb16	+	+	+	+
Mrb18	-	-	+	-
Mrb21	-	-	+	+

Keterangan/Note :

+ = Menunjukkan aktivitas/*Indicates activity.*

- = Tidak menunjukkan aktivitas/*No activity.*

mampu menghidrolisa senyawa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetil glukosamin dengan menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik (Dahiya *et al.* 2006).

Enzim protease, enzim kitinase, dan HCN merupakan senyawa yang diproduksi pada mekanisme antibiosis. Satu agens hayati dapat memproduksi salah satu atau lebih dari ketiga senyawa di atas (Sivasakthi *et al.* 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Wiratno *et al.* (2019) menyatakan bahwa isolat bakteri yang memproduksi enzim kitinase efektif dalam menghambat perkembangan *Fusarium* spp. Tan *et al.* (2015) juga melaporkan bakteri endofit yang memiliki aktifitas proteolitik mampu menghambat perkembangan *Fusarium* spp. secara *in vitro*. Selanjutnya, bakteri yang memproduksi HCN juga dilaporkan efektif dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. secara *in vitro* (Wiratno *et al.* 2019).

Enzim protease dan kitinase dilaporkan mampu mendegradasi dinding sel *Fusarium* spp. (Anitha dan Rabeeth 2010). Dinding sel cendawan patogen tanaman umumnya terdiri dari bahan fibrillar yang melekat pada gula, protein, lipid, dan berbagai polisakarida. Kerusakan dinding sel akan menyebabkan pertumbuhan *Fusarium* spp. terhambat. Komponen-komponen penyusun dinding sel memiliki peran yang besar dalam transportasi nutrisi, degradasi substrat, dan

komunikasi (*signalling*) (Quecine *et al.* 2008; Tang-um dan Niamsup 2012). Sekitar 80 % dinding sel cendawan patogen tanaman terdiri atas polisakarida. Struktur serat yang terdapat pada dinding sel cendawan tersusun atas chitin, chitosan,  $\beta$ -glukan, dan berbagai heteropolysaccharides (Bartnicki-Garcia dan Lippman 1989; Bowman dan Free 2006).

Diduga kemampuan bakteri asal *N. mirabilis* dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. ada kaitannya dengan kemampuannya memproduksi enzim ekstraseluler dan senyawa HCN. Isolat Mrb16 mampu memproduksi enzim protease, enzim kitinase, dan HCN. Isolat Mrb6 mampu memproduksi enzim kitinase dan protease. Isolat Mrb2 mampu memproduksi enzim kitinase (Tabel 4).

Agens hayati juga diketahui memiliki peran ganda, selain mampu melindungi tanaman dari infeksi patogen, juga mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui berbagai mekanisme (Santoyo *et al.* 2012). Bakteri pelarut fosfat dapat melarutkan fosfat dari ikatan fosfat tak larut melalui mekanisme sekresi asam-asam organik atau mineralisasi fosfat dari bentuk ikatan fosfat-organik menjadi fosfat-anorganik (Chen *et al.* 2006). Beberapa isolat bakteri pelarut fosfat memiliki kemampuan sebagai agens pemacu pertumbuhan dan juga sebagai agens hayati (Vassilev *et al.* 2006).



**KESIMPULAN**

Terdapat 10 isolat bakteri asal perakaran *N. mirabilis* dengan karakter fisiologi yang beragam, yakni mampu memproduksi enzim protease, enzim kitinase, senyawa volatil HCN atau melarutkan fosfat. Tiga isolat diantaranya bersifat antagonis terhadap *F. oxysporum*, yang ditunjukkan dengan kemampuan menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro*. Ketiga isolat tersebut adalah isolat Mrb16 dengan kemampuan penghambatan 67 %, Mrb6 (60 %), dan Mrb2 (5 %).

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mukhammad Johannari, S.P. dan Megariana Mangande, S.P. atas bantuannya selama proses penelitian.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Anitha, A. & Rabeeth, M. (2010) Degradation of Fungal Cell Walls of Phytopathogenic Fungi by Lytic Enzyme of *Streptomyces griseus*. *African Journal of Plant Science*. 4 (3), 61-66.
- Balint-Kurti, P. (2019) The Plant Hypersensitive Response: Concepts, Control and Consequences. *Molecular Plant Pathology*. 20 (8), 1163-1178. doi:10.1111/mpp.12821.
- Bartnicki-Garcia, S. & Lippman, E. (1989) Fungal Cell Wall Composition. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 381-404.
- Bhore, S.J., Komathi, V. & Kandasamy, K.I. (2013) Diversity of Endophytic Bacteria in Medicinally Important *Nepenthes* Species. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 4 (2), 431-434. doi:10.4103/0976-9668.117022.
- Bowman, S.M. & Free, S.J. (2006) The Structure and Synthesis of the Fungal Cell Wall. *Bioessays*. 28 (8), 799-808. doi:10.1002/bies.20441.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. & Young, C. (2006) Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. *Applied Soil Ecology*. 34 (1), 33-41. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.002.
- Dahiya, N., Tewari, R. & Hoondal, G.S. (2006) Biotechnological Aspects of Chitinolytic Enzymes: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71 (6), 773-782. doi:10.1007/s00253-005-0183-7.
- Daras, U. & Pranowo, D. (2017) Kondisi Kritis Lada Putih Bangka Belitung dan Alternatif Pemulihannya. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 28 (1), 1-6.
- Das, G. & Prasad, M.P. (2010) Isolation, Purification & Mass Production of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research Journal of Microbiology*. 1 (2), 26-31.
- Fravel, D., Olivain, C. & Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its Biocontrol. *New Phytologist*. 157 (3), 493-502. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x.
- Gregersen, T. (1978) Rapid Method for Distinction of Gram-negative from Gram-positive Bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 5 (2), 123-127. doi:10.1007/BF00498806.
- Guillaud, C., Loustau, V. & Michel, M. (2012) Hemolytic Anemia in Adults: Main Causes and Diagnostic Procedures. *Expert Review of Hematology*. 5 (2), 229-241. doi:10.1586/ehm.12.3.
- Haggag, W.M. & Mohamed, H.A.A. (2007) Biotechnological Aspects of Microorganisms used in Plant Biological Control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 1 (1), 7-12.
- Ilma, S., Rohman, F. & Ibrohim, I. (2014) Analisis Vegetasi *Nepenthes spp.* di Hutan Penelitian Universitas Borneo Tarakan. In: *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning*. 11 (1), pp. 284-289.
- Klement, Z. & Goodman, R.N. (1967) The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 5 (1), 17-44.
- Larkin, R.P. & Fravel, D.R. (1998) Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of *Fusarium* wilt of Tomato. *Plant Disease*. 82 (9), 1022-1028. doi:10.1094/PDIS.1998.82.9.1022.
- Li, W-P., Li S-J., Li J-C., Ye G-C., Zhu L-F., Wang X-X., An W-X., Yang L. & Liu Y. (2012) Isolation and Identification of the

- Protease Producing Endophyte Bacteria from *Nepenthes mirabilis*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 32 (12), 2551-2555.
- Li, Y., Chi, L.D., Mao, L.G., Yan, D.D., Wu, Z.F., Ma, T.T., Guo, M.X., Wang, Q.X., Ouyang, C.B. & Cao, A.C. (2014) First Report of Ginger Rhizome Rot Caused by *Fusarium oxysporum* in China. *Plant Disease*. 98 (2), 282. doi:10.1094/PDIS-07-13-0729-PDN.
- Lorck, H. (1948) Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. *Physiologia Plantarum*. 1 (2), 142-146. doi:10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x.
- Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. & Freitas, H. (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Endophytes Accelerate Phytoremediation of Metalliferous Soils. *Biotechnology Advances*. 29 (2), 248-258. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.12.001.
- Mardhiana, Ankardiansyah, P.P., Adiwena, Muh., Dwi, S., Rizza, W., & Aditya, M. (2017) Use of Endophytic Bacteria from Roots of *Cyperus rotundus* for Biocontrol of *Meloidogyne incognita*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 18 (4), 1308-1315. doi:10.13057/biodiv/d180404.
- Munif, Abdul, Supramana, Elis, N.H. & Ankardiansyah, P.P. (2019) Endophytic Bacterial Consortium Originated from Forestry Plant Roots and Their Nematicidal Activity Against *Meloidogyne incognita* Infestation in Greenhouse. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 67 (5), 1171-1182. doi:10.11118/actaun201967051171
- Munif, A., Hallmann, J. & Sikora, R.A. (2012) Isolation of Root Endophytic Bacteria from Tomato and its Biocontrol Activity Against Fungal Diseases. *Microbiology Indonesia*. 6 (4), 148-156. doi:10.5454/mi.6.4.2.
- Munif, A. & Sulistiawati, I. (2014) Pengelolaan Penyakit Kuning pada Tanaman Lada oleh Petani di Wilayah Bangka. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 10 (1), 8-16. doi:10.14692/jfi.10.1.8.
- Nugraheni, E.S. (2010) Karakterisasi Biologi Isolat-isolat *Fusarium* sp pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum* L.) asal Boyolali. [Disertasi]. Universitas Sebelas Maret, Indonesia.
- Oktafiyanto, M.F., Munif, A. & Mutaqin, K.H. (2018) Aktivitas Antagonis Bakteri Endofit asal Mangrove terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Meloidogyne* spp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 14 (1), 23-29. doi:10.14692/jfi.14.1.23.
- Payment, P., Coffin, E. & Paquette, G. (1994) Blood Agar to Detect Virulence Factors in Tap Water Heterotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (4), 1179-1183.
- Prabowo, A.K.E., Prihatiningsih, N. & Soesanto, L. (2006) Potensi *Trichoderma harzianum* dalam Mengendalikan Sembilan Isolat *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *zingiberi* Trujillo pada Kencur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*. 8 (2), 76-84.
- Pradana, A.P., Putri, D. & Munif, A. (2015) Eksplorasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Adam Hawa dan Potensinya sebagai Agens Hayati dan Pemacu Pertumbuhan Tanaman Padi. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 11 (3), 73-78. doi:10.14692/jfi.11.3.73.
- Prihatiningsih, N., Arwiyanto, T., Hadisutrisno, B. & Widada, J. (2015) Mekanisme Antibiosis *Bacillus subtilis* B315 untuk Pengendalian Penyakit Layu Bakteri Kentang. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 15 (1), 64-71. doi:10.23960/j.hppt.11564-71
- Quecine, M.C., Araujo, W.L., Marcon, J., Gai, C.S., Azevedo, J.L., Pizzirani-Kleiner, A.A. (2008) Chitinolytic Activity of Endophytic *Streptomyces* and Potential for Biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (6), 486-491. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02428.x.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. del C. & Govindappa, M. (2012) Mechanisms of Biocontrol and Plant Growth-promoting Activity in Soil Bacterial Species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A Review. *Biocontrol Science and Technology*. 22 (8), 855-872. doi:10.1080/09583157.2012.694413.
- Sessitsch, A., Reiter, B. & Berg, G. (2004) Endophytic Bacterial Communities of Field-grown Potato Plants and Their Plant-growth-promoting and Antagonistic Abilities. *Canadian Journal of Microbiology*. 50 (4), 239-249. doi:10.1139/w03-118.
- Sharma, S., Kumar, V. & Tripathi, R.B. (2011) Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) from Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 1 (2), 90-95.

- Sivasakthi, S., Usharani, G. & Saranraj, P. (2014) Biocontrol Potentiality of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A Review. *African Journal of Agricultural Research*. 9 (16), 1265-1277.
- Tan, D., Fu, L., Han, B., Sun, X., Zheng, P. & Zhang, J. (2015) Identification of an Endophytic Antifungal Bacterial Strain Isolated from the Rubber Tree and its Application in the Biological Control of Banana Fusarium wilt. *PLoS One*. 10 (7), 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0131974.
- Tang-um, J. & Niamsup, H. (2012) Chitinase Production and Antifungal Potential of Endophytic *Streptomyces* Strain P4. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 6 (1), 95-104.
- Tariq, M., Noman, M., Ahmed, T., Hameed, A., Manzoor, N. & Zafar, M. (2017) Antagonistic Features Displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. *Journal of Plant Science and Phytopathology*. 1, 38-43.
- Vassilev, N., Vassileva, M. & Nikolaeva, I. (2006) Simultaneous P-solubilizing and Biocontrol Activity of Microorganisms: Potentials and Future Trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71 (2), 137-144. doi:10.1007/s00253-006-0380-z.
- Walsh, C.T. & Wencewicz, T.A. (2014) Prospects for New Antibiotics: a Molecule-centered Perspective. *The Journal of antibiotics*. 67 (1), 7-22. doi:10.1038/ja.2013.49.
- Wiratno, Syakir, M., Sucipto, I., & Pradana, A.P. (2019) Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Roots of *Piper nigrum* and Their Activities Against *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 20 (3), 682-687. doi:10.13057/biodiv/d200310.
- Zhao, Q., Dong, C., Yang, X., Mei, X., Ran, W., Shen, Q. & Xu, Y. (2011) Biocontrol of Fusarium Wilt Disease for *Cucumis melo* Melon using Bio-organic Fertilizer. *Applied Soil Ecology*. 47 (1), 67-75. doi:10.1016/j.apsoil.2010.09.010.