

**KEEFEKTIFAN *Bacillus* sp. DAN *Pseudomonas fluorescens* MENGENDALIKAN  
*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DAN *Meloidogyne* sp. PENYEBAB  
PENYAKIT LAYU PADA TOMAT SECARA *IN VITRO***

**Ruth Feti Rahayuniati dan Endang Mugastuti**  
Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto  
Email: rf\_rahayuniati@yahoo.com  
(Diterima: 2 Mei 2012, disetujui: 15 Juni 2012)

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri antagonis *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* dari perakaran tanaman tomat yang secara *in vitro* memiliki kemampuan kitinolitik, mampu menekan *Fusarium oxysporum* pada tanaman tomat secara *in vitro*, dan memiliki kemampuan untuk menekan penetasan telur nematoda. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* yang berasal dari perakaran tanaman tomat bersifat kitinolitik, (2) kedua bakteri tersebut dapat menekan pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro* sebesar 3,22-66,67%, dan (3) kedua bakteri tersebut secara *in vitro* dapat menghambat penetasan telur *Meloidogyne* sebesar 17,15-64,85%.

Kata kunci: *Bacillus* sp., *P. fluorescens*, *F. oxysporum*, *Meloidogyne* sp, tanaman tomat

**ABSTRACT**

The aims of this study were to get antagonistic bacteria isolates *Bacillus* sp. and *Pseudomonas fluorescens* from the rhizosphere of tomatoes that have chitinolytic ability *in vitro*, ability to suppress *Fusarium oxysporum* on tomato *in vitro*, and ability to suppress *Meloidogyne* eggs hatching *in vitro*. This study was conducted at Microbiology Laboratory of Agriculture Faculty of Jenderal Soedirman University. The result of this study were (1) *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* from the tomato rhizosphere have chitinolytic ability, (2) both bacteria can suppress *F. oxysporum* growth *in vitro* about 3.22-66.67%, and (3) both bacteria can inhibit eggs hatching of *Meloidogyne* about 17.15-64.85 %.

**Key words:** *Bacillus* sp., *P. fluorescens*, *F. oxysporum*, *Meloidogyne* sp, tomato

**PENDAHULUAN**

Upaya untuk meningkatkan produksi tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill) sering kali dihadapkan pada masalah gangguan organisme pengganggu tumbuhan (OPT). Salah satu OPT penting pada tanaman tomat adalah *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* yang merupakan patogen penyebab penyakit layu pada tanaman tomat dan mampu menimbulkan kerugian ekonomi yang tinggi. Di lapangan, keparahan penyakit ini semakin meningkat dengan keberadaan nematoda puru akar *Meloidogyne*.

Pengendalian umumnya dilakukan dengan pestisida kimiawi (Wiryanta, 2002). Sementara itu, penggunaan pestisida yang kurang bijaksana sering menimbulkan berbagai dampak negatif.

Penggunaan bakteri antagonis merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengendalikan sinergi kedua organisme tersebut. Kelebihan pengendalian dengan memanfaatkan bakteri antagonis adalah bahwa bakteri antagonis bersifat hidup dan dapat berkembang biak sehingga kemempnannya di lapangan dapat bertahan lama dan berkelanjutan. Salah satu

bakteri antagonis yang potensial mengendalikan *F. oxysporum* dan *Meloidogyne* adalah *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus* sp. Menurut Ghasemi *et al.* (2010), dan Chi-yea *et al.*, (2009), *Bacillus* mampu menghasilkan enzim kitinase. Demikian juga Shan-lang *et al.* (2008) dan Kumar *et al.* (2007) menyatakan bahwa *P. fluorescens* juga mampu menghasilkan enzim kitinase. Diduga enzim kitinase tersebut dapat mendegradasi kulit telur nematoda dan dinding sel *Fusarium* sehingga mampu menekan pertumbuhan dan perkembangan kedua organisme pengganggu tersebut yang pada akhirnya dapat menurunkan tingkat serangannya.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri antagonis *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* dari perakaran tanaman tomat yang secara *in vitro* memiliki kemampuan kitinolitik, mampu menekan *Fusarium oxysporum* pada tanaman tomat secara invitro, dan memiliki kemampuan untuk menekan penetasan telur nematoda.

#### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Perlindungan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman. Penelitian dilaksanakan selama 4 bulan.

##### 1. Materi Penelitian

Sampel tanah diambil dari lahan sentra produksi tanaman tomat di Kabupaten Banyumas Jawa Tengah. Medium yang digunakan untuk isolasi *Bacillus* menggunakan medium YPGA, sedangkan medium King's B untuk *P. fluorescens*. Selain itu digunakan beberapa bahan lain, yaitu medium *PDA*, agar kitin (0,5 % koloid kitin, 0,1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02%  $K_2HPO_4$ , 0,1 %

ekstrak yeast, 1,5 % agar), alkohol 70% dan 95%, nigrosin, *malachite green*, spiritus, buffer fosfat pH 7 + 0,1% pepton, streptomisin sulfat, dan sikloheksimid.

Pensterilan alat dan medium menggunakan autoklaf dengan sumber panas kompor gas. Di samping itu, juga digunakan beberapa alat bantu yang lain, yaitu labu Erlenmeyer, cawan Petri, tabung reaksi, lampu spiritus, jarum ose, mikropipet, mikroskop, haemasiometer, micrometer, neraca analitis, vortex, gelas L, gelas beker, kamera, lampu uv, oven, saringan nematoda 500 mesh, ruangan pendingin.

##### 2. Rancangan Penelitian

Penelitian meliputi beberapa tahap:

###### a. Eksplorasi dan penapisan bakteri antagonis

Penelitian dilaksanakan secara survei dengan metode penentuan lokasi pengambilan sampel secara *purposive random sampling*. Dipilih lahan tanaman tomat yang terinfeksi *M. incoqnita* dan *F. oxysporum* dengan cara melihat gejala serangannya (tanaman layu bertahap serta pada akar terdapat puru). Pada setiap lokasi terpilih diambil 5 titik pengambilan sampel, masing-masing diambil tanahnya sebanyak  $\pm 0,5$  kg.

Isolasi bakteri *P. fluorescens* dilakukan dengan cara melarutkan tanah sebanyak 100 g ke dalam 90 ml buffer fosfat+0,5% pepton pada labu Erlenmeyer 250 ml. Tabung digojog kuat selama 30 menit, kemudian didiamkan selama lima menit. Suspensi yang diperoleh diencerkan per sepuluh kali dengan air steril. Pada seri pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  masing-masing diambil 0,1 ml dan ditumbuhkan pada medium King's B yang ditambah 100 ppm sikloheksimid

untuk menekan pertumbuhan jamur. Biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam (Diany dan Arwiyanto, 1996 ; Soesanto *et. al.*, 2007)). Pengujian fluorescens dilakukan dengan menggunakan lampu uv. Jumlah koloni *P. fluorescens* yang tumbuh juga dihitung sekaligus untuk mengetahui kepadatannya (upk/g). Koloni tunggal yang diperoleh dimurnikan lagi dalam medium King's B yang baru untuk pengujian selanjutnya.

Isolasi bakteri *Bacillus* sp. Dilakukan dengan mengoven tanah sebanyak 100 g pada suhu 80 C selama 30 menit kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml buffer fosfat + 0,5% pepton. Tabung digojog kuat selama 30 menit, kemudian didiamkan selama lima menit. Suspensi yang diperoleh diencerkan per sepuluh kali dengan air steril. Pada seri pengenceran  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  masing-masing diambil 0,1 ml dan ditumbuhkan pada medium NA yang ditambah 100 ppm sikloheksimid untuk menekan pertumbuhan jamur. Biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diuji sifat gramnya dengan KOH 3% dan uji katalase dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5%. Koloni gram positif diambil dan ditumbuhkan pada medium NA baru (Risamena dan Arwiyanto, 1996). Koloni tunggal yang diperoleh dimurnikan lagi dalam medium NA baru untuk pengujian selanjutnya. Jumlah koloni *Bacillus* sp. yang tumbuh juga dihitung sekaligus untuk mengetahui kepadatannya (upk/g).

#### **b. Pengujian kemampuan kitinolitik bakteri *Bacillus* sp. dan *P. fluorescens***

Seleksi bakteri kitinolitik dilakukan dengan cara menumbuhkan kembali secara serentak semua isolat bakteri (*Bacillus* dan *Pseudomonas*)

yang diperoleh dengan cara diceratkan pada medium agar kitin. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30<sup>0</sup>C (Pujiyanto *et al.*, 2008).

#### **c. Uji hayati kemampuan *Bacillus* sp. dan *P. fluorescens* kitinolitik terhadap penetasan telur *M. incoqnita***

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Kelompok. Sebagai perlakuan adalah jenis isolat *Bacillus* (5 isolat) dan *Pseudomonas* (5 isolat). Tiap perlakuan diulang tiga kali.

Telur *M. incoqnita* sebanyak 200 butir ditempatkan dalam tabung eppendorf, selanjutnya diinokulasi dengan biakan mikroba sebanyak 1 ml. Sebagai kontrol telur *M. incoqnita* ditambahkan dengan air steril. Tabung eppendorf kemudian diinkubasikan pada suhu ruang.

#### **d) Uji hayati kemampuan *Bacillus* sp. dan *P. fluorescens* kitinolitik terhadap pertumbuhan *F. oxysporum* secara in vitro**

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Kelompok. Sebagai perlakuan adalah jenis isolat *Bacillus* (5 isolat) dan *Pseudomonas* (5 isolat). Tiap perlakuan diulang tiga kali. Jamur ditumbuhkan pada medium PDA, di satu sisi cawan berjarak 3 cm dari tepi cawan Petri dan *Bacillus* sp. di sisi yang berlawanan dengan jarak 3 cm dari patogen, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan diamati pertumbuhan kedua jenis mikroba tersebut.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada tahap pertama penelitian, dilakukan isolasi bakteri antagonis dengan tujuan utama mengisolasi *Bacillus* sp. dan *P. fluorescens* dari tanah yang telah diambil dari lokasi terpilih.

Pada tahap ini telah berhasil diperoleh isolat sasaran yaitu *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* kelompok *fluorescens*. Hasil pengujian gram terhadap kedua isolat tersebut menunjukkan negatif, dengan uji katalase positif. Pengamatan terhadap sifat pendar *Pseudomonas* dilakukan di bawah sinar uv, dan diketahui bahwa isolat yang diperoleh tersebut bersifat pendar (*fluorescens*). Kedua kelompok isolat inilah yang kemudian diuji lanjut.

Tahap kedua penelitian adalah pengujian kedua kelompok mikroba tersebut dalam hal kemampuannya untuk menghasilkan kitin. Ada atau tidaknya kitin dapat diketahui dari ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri bila ditumbuhkan pada medium agar kitin (Pujiyanto, 2008). Zona bening tersebut merupakan indikasi bahwa bakteri mampu mendegradasi kitin atau dengan kata lain mampu menghasilkan enzim kitinase (Tabel 1).

**Tabel 1. Kemampuan *Bacillus* sp. (B) dan *P. fluorescens* (P) dalam mendegradasi kitin dan menghambat pertumbuhan *F. oxysporum***

Isolat	Zona bening	% penghambatan
B1	+	33,33
B2	+	3,22
B3	+	35,48
B4	+	0
B5	+	37,5
B6	+	0
B7	+	37,5
B8	+	66,67
B9	-	0
B10	+	41,94
B11	++	33,33
B12	-	3,22
B13	-	44,44
P1	+	0
P2	+	0
P3	+	42,86
P4	+	20
P5	+	20
P6	-	0
P7	+	33,33

Keefektifan *Bacillus* Sp. Dan *Pseudomonas*... (Ruth dan Endang)

P8	+	34,78
P9	+	25
P10	-	32,43
P11	-	46,15
P12	+	41,67
P13	++	30,30
P14	-	50
P15	-	39,29
P16	++	55,88
P17	+	41,17

Keterangan:

+++; zona bening yang terbentuk sangat luas (kemampuan mendegradasi kitin tinggi), ++: zona bening luas (kemampuan mendegradasi kitin sedang), +: zona bening tidak sempit (kemampuan mendegradasi kitin rendah), -: tidak ada zona bening (tidak mampu mendegradasi kitin).

Pengujian bakteri antagonis (*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* kelompok *fluorescens*) terhadap *F. oxysporum* secara in vitro menunjukkan hasil yang beragam (Tabel 1.). Sebagian besar bakteri antagonis yang diisolasi dan diuji menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara in vitro. Sebelas dari 13 isolat *Bacillus* sp. mampu menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* dengan persentase penghambatan 3,22-66,67 %. Daya hambat tertinggi terdapat pada perlakuan *Bacillus* sp. B8 sebesar 66,67 %. Sementara itu, untuk *Pseudomonas* kelompok *fluorescens* dari 17 isolat yang diuji, 14 isolat mampu menghambat pertumbuhan jamur dengan penghambatan 20-55,88%. Daya hambat tertinggi terdapat pada perlakuan *Pseudomonas* P16 sebesar 55,88 %.

Kemampuan menghambat pertumbuhan jamur *F. oxysporum* dari bakteri antagonis tersebut diduga berkaitan dengan kemampuannya menghasilkan enzim kitinase (Tabel 1), Enzim kitinase ini akan mendegradasi kitin yang terdapat pada dinding sel jamur, sehingga jamur akan mengalami lisis. Menurut Adam (2004), dinding sel jamur merupakan struktur kompleks

yang terdiri dari kitin, glukans dan polimer lainnya.

**Tahap 4. Pengujian daya hambat *Bacillus* dan *P. fluorescens* terhadap penetasan telur nematodo**

Perlakuan	Penghambatan penetasan telur <i>Meloidogyne</i> sp. (%)
Kontrol	18,88
B1	17,15
B4	35,82
B8	45,09
B10	43,15
B11	53,33
P3	34,91
P7	45,64
P8	62,30
P9	54,06
P13	39,30
P16	64,85

Pada pengujian bakteri antagonis dalam menghambat penetasan telur *M. incognita* tidak dilakukan pada semua isolat bakteri antagonis, tetapi hanya dipilih 5 isolat *Bacillus* sp dan 6 isolat *Pseudomonas*, dengan mempertimbangkan hasil pengujian degradasi kitin dan penghambatan terhadap *F. oxysporum* secara *in vitro*. Hasil pengujian menunjukkan beberapa bakteri antagonis mampu menghambat persentase penetasan telur *M. incognita* sampai lebih dari 40%, di antaranya *Bacillus* sp B8, B10, dan B11 serta *Pseudomonas* P7, P8, P9, dan P16 (Tabel 3). Daya hambat tertinggi terdapat pada perlakuan *Pseudomonas* P16 sebesar 64,85 %.

Kegagalan penetasan telur diduga disebabkan adanya degradasi telur nematoda oleh bakteri antagonis. Menurut Nguyen *et al.* (2007), mekanisme yang terlibat dalam parasitisme telur nematoda diperkirakan bahwa degradasi enzimatik kulit telur sebagai salah satu langkah dalam proses penetrasi. Lebih lanjut Spiegel dan Cohn (1985);

Jurnal Pembangunan Pedesaan Volume 12 Nomor 1, Juni 2012, hal 65 - 70

Bird dan Self (1985) serta Nguyen *et al.* (2007) menjelaskan bahwa telur nematoda terdiri dari kitin yang terdapat pada bagian tengah kulit telur, dengan tebal 50-400 nm. Adanya lapisan tersebut diduga menjadi pelindung yang kuat bagi nematoda sebelum menetas. Enzim kitinase yang dihasilkannya bakteri antagonis dapat membantu degradasi kitin yang terdapat pada kulit telur nematoda, yang pada akhirnya mengganggu penetasan telur nematode.

#### KESIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa dari *rhizosfer* tanaman tomat telah berhasil diisolasi *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* kelompok *fluorescens* yang mempunyai aktivitas kitinolitik. *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* kelompok *fluorescens* (hasil no 1) mampu menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro*, sebesar 3,22-66,67 %. Selain itu, *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* kelompok *fluorescens* (hasil no 1) mampu menghambat penetasan telur nematoda dengan penghambatan sebesar 17,15-64,85 %.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DIPA Universitas Jenderal Soedirman Tahun Anggaran 2011 melalui Hibah Penelitian Pemula yang telah mendanai penelitian ini, dan kepada Yulianto yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029–2035.
- Bird, A.F. And P.G. Self. 1995 Chitin in *Meloidogyne javanica* *Fundam. Appl. Nematol.*, 18 (3), 235-239

- Chi-Yea, Y.; H. Yi-Cheng, P. Jen-Chieh, H. Shiang-Suo, and T.J. Seng-Ming. 2009. Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field, *Bioresource Technology* 100(3):1454-1458.
- Diany, V. dan T. Arwiyanto. 1996. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Bakteri Pada Tanaman Tembakau dengan Fluoresen *Pseudomonads*: Isolasi Mikroorganisme Antagonis. *Makalah Seminar Regional III PFI Komda Jateng-DIY* di Salatiga.
- Ghasemi, S., A. Gholamreza, J. Nadali, R. Heshmatollah, G. Soheila, D. Ali, and S. Parvin, 2010. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report . *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 26(8):1437-1443.
- Kumar, A.N., K. Min Jeong, K. Sun Chul, and M.D. Kumar, 2007. Role of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*, *Canadian Journal of Microbiology* 53(2):207-212.
- Nguyen, N.V., Y. Ju Kim, K. Taek Oh, W. Jin Jung and R-Dong Park. 2007. The role of chitinase from *Lecanicillium antillanum* B-3 in parasitism to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. *Biocontrol Science and Technology* 17(10): 1047\_1058
- Pujiyanto, S., E. Kusdiyantini, dan M. Hadi. 2008. Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik Isolat lokal yang Berpotensi untuk mengendalikan Larva Nyamuk *Aedes aegypti* L. *Biodiversitas* 9(1): 5-8.
- Risamena, J.J. dan T. Arwiyanto. 1996. Pengendalian hayati Penyakit layu Bakteri Pada Tanaman Tembakau dengan *Bacillus* spp: Isolasi mikroorganisme antagonis. *Makalah Seminar Regional III PFI Komda Jateng-DIY* di Salatiga.
- San-Lang, W. C. Shin-Jen, and W. Chuan-Lu, 2008. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate, *Carbohydrate Research* 343(7):1171-1179.
- Soesanto,L., Santoso, S.E., dan T.A.D. Haryanto. 2007. Penekanan hayati penyakit moler Keefektifan *Bacillus* Sp. Dan *Pseudomonas*... (Ruth dan Endang) pada bawang merah dengan *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, dan *Pseudomonas fluorescens* P60. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 7(1):53-61.
- Spiegel , Y. and E. Cohn. 1985. Chitin is present in gelatinous matrix of *Meloidogyne*. *Revue Nérmatol.*, 8 (2) : 179-190
- Wiriyanta, B.T.W. 2002. Bertanam Tomat. Agromedia Pustaka, Jakarta. 100 hal.