

KELIMPAHAN BAKTERI RIZOSFER PADA SISTEM PHT-BIOINTENSIF SERTA KEMAMPUAN ANTAGONISMENYA TERHADAP *SCLEROTIUM ROLFSII* PADA KEDELAI

Abdjad Asih Nawangsih, Tita Widjayanti, & Yana Anisa

Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680
E-mail: asnawangsih@yahoo.com

ABSTRACT

Abundance of rhizospheric bacteria on the IPM-Biointensive system and their antagonistic activities toward *Sclerotium rolfsii* on soybean. Abundance of beneficial microorganisms in the soil is one of the active soil indicators the success of integrated pests management (IPM) system. Some beneficial groups of microorganisms can be used as biocontrol agents. This experiment was conducted to evaluate the effects of IPM-Biointensive by integrated application of resistant varieties, rice-straw mulch, and biocontrol agents on the abundance of rizospheric bacteria of soybean, also to evaluate the suppressiveness of the bacteria to the mycelial growth of *S. rolfsii* in vitro. Abundance of the bacteria was determined by isolation using serial dilution and plate-count techniques. Suppression to the fungus was evaluated using dual culture technique. Heat tolerant bacteria had the highest abundance (ranged 10^{11} - 10^{12} cfu/g soil), followed by non-fluorescence bacteria (10^{11} cfu/g soil), chitinolytic bacteria (10^6 - 10^9 cfu/g soil), and fluorescence bacteria with population range was 10^3 - 10^8 cfu/g soil. Gepak kuning variety grown with application of rice-straw mulch and PGPR ($V_2M_1P_1$) caused the highest abundance of rizosphere bacteria. One of the heat tolerant bacteria, i.e. TP32, caused the highest suppression to the mycelial growth of *S. rolfsii* in vitro. Based on the morphology, physiology, and biochemical properties, the isolate was identified as *Bacillus* sp.

Key words: Anjasmoro, *Bacillus subtilis*, biological control, Gepak kuning, PGPR

ABSTRAK

Kelimpahan bakteri rizosfer pada sistem PHT-Biointensif serta kemampuan antagonismenya terhadap *Sclerotium rolfsii* pada kedelai. Kelimpahan mikroorganisme yang menguntungkan dalam tanah merupakan salah satu indikator tanah aktif yang menjadi salah satu indikator keberhasilan sistem pengendalian hama terpadu (PHT). Beberapa kelompok mikroorganisme terutama bakteri menguntungkan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai agen biokontrol. Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengevaluasi pengaruh aplikasi PHT-Biointensif dengan penggunaan varietas tahan, pemberian mulsa jerami dan aplikasi agen biokontrol secara terpadu terhadap kelimpahan bakteri rizosfer kedelai serta mengevaluasi kemampuan bakteri tersebut dalam menekan pertumbuhan miselia *S. rolfsii* secara in vitro. Penghitungan kelimpahan bakteri dilakukan dengan cara mengisolasi bakteri rizosfer tanaman kedelai dengan metode pengenceran berseri dan pencawanan (*plate-count*). Uji penekanan pertumbuhan miselia dilakukan dengan metode *dual culture*. Bakteri tahan panas memiliki kelimpahan paling tinggi dengan kisaran 10^{11} - 10^{12} cfu/g tanah, diikuti dengan bakteri non-fluorescence dengan kelimpahan 10^{11} cfu/g tanah, bakteri kitinolitik dengan kisaran 10^6 - 10^9 cfu/g tanah dan bakteri kelompok fluorescence dengan kelimpahan 10^3 - 10^8 cfu/g tanah. Kelimpahan bakteri paling tinggi terjadi pada petak yang ditanami varietas Gepak Kuning dengan aplikasi mulsa jerami dan PGPR ($V_2M_1P_1$). Salah satu isolat bakteri rizosfer, yaitu TP32, mampu menekan pertumbuhan miselia *S. rolfsii* secara in vitro dengan persentase penghambatan paling tinggi hingga mencapai 95,6%. Berdasarkan ciri-ciri morfologi, fisiologi dan biokimia, bakteri tersebut merupakan kelompok *Bacillus* sp.

Kata kunci: Anjasmoro, *Bacillus subtilis*, pengendalian biologi, Gepak kuning, PGPR

PENDAHULUAN

Indikator keberhasilan sistem PHT-Biointensif salah satunya adalah tanah aktif. Hal ini sangat berhubungan dengan kelimpahan bakteri yang menguntungkan dalam tanah. Banyak bakteri tanah yang telah diketahui mampu menghambat pertumbuhan

patogen dan meningkatkan pertumbuhan tanaman diantaranya: kelompok bakteri kitinolitik, *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens* dan Actinomycetes (Baker & Cook, 1983; Bolan, 1991).

Bakteri kitinolitik merupakan bakteri yang kompeten memproduksi enzim kitinase dan memanfaatkan kitinase untuk asimilasi kitin sebagai

sumber karbon dan nitrogen (Wu *et al.*, 2001). Kitinase dapat mendegradasi kitin yang merupakan komponen penting pada dinding sel cendawan, integumen serangga, dan kerangka luar golongan arthropoda, moluska, nematoda dan protozoa (Wang & Chang, 1997).

Sudjono (1997) melaporkan bakteri kitinolitik *Arthobacter* sp. dan *Hafnia* sp. telah diketahui mampu mengendalikan *Fusarium* sp. dan *Sclerotinia* sp. pada tanaman tomat dan arbei. Genus bakteri yang telah banyak dilaporkan menghasilkan kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudo-alteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia* dan *Vibrio* (Chernin *et al.*, 1998). Beberapa spesies yang telah dipelajari antara lain *Aeromonas* sp., *Bacillus cereus*, *B. licheformis* (Pleban *et al.*, 1997), *Clostridium* sp., *Enterobacter liquefaciens*, *Flavobacterium indoltheticum*, *Klebsiella* sp., *Micrococcus colpogenes*, *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Bacillus* dan *Pyrococcus* (Gao *et al.*, 2003).

Selain bakteri kelompok kitinolitik, bakteri tanah lain yang diketahui mampu menghambat pertumbuhan patogen adalah bakteri tahan panas. Menurut Schaad (2001) bakteri tahan panas yang telah banyak diketahui adalah bakteri golongan *Bacillus* sp. Sebagian besar bakteri genus *Bacillus* sp. bersifat saprofitik. *Bacillus* sp. memiliki daya tahan hidup yang cukup tinggi khususnya terhadap suhu tinggi karena menghasilkan endospora tahan panas (Compant *et al.*, 2005), sehingga sangat potensial digunakan sebagai agens pengendali hayati patogen tumbuhan. Peran *Bacillus* sp. sebagai agens pengendali hayati sangat bervariasi tergantung isolat antagonis, patogen dan lingkungannya (Arwiyanto *et al.*, 1999). Wartono (2010) melaporkan *B. subtilis* efektif menekan perkembangan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* di lapangan serta efektif dalam meningkatkan bobot gabah kering di lapangan mencapai 69,2 g/rumpun.

Kelompok bakteri lain yang berpotensi sebagai agens hayati adalah bakteri *P. fluorescens*. Bakteri kelompok ini dicirikan dengan menghasilkan pigmen berwarna hijau kuning yang dapat digunakan untuk identifikasi serta klasifikasi yang berupa senyawa fluorescence atau pyoverdine yang berpendar di bawah cahaya ultraviolet (panjang gelombang 266 nm). Mariani (1995) telah berhasil mengisolasi 52 isolat bakteri dari daun kedelai, dan diperoleh 3 isolat masing-masing isolat B29, B30, dan B39 yang dinyatakan berpotensi untuk dikembangkan sebagai agens biokontrol. Mishra *et al.* (2011) melaporkan bahwa *Pseudomonas* kelompok fluorescence yang diaplikasikan secara tunggal maupun dikombinasikan dengan *Trichoderma harzianum*

mampu menekan kejadian penyakit yang disebabkan oleh *S. rolfisii* di rumah kaca hingga 47,68%.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, dan di lahan petani di Desa Ciburuy, Kecamatan Cigombong, Sukabumi. Lahan petani tersebut berada pada ketinggian 495 m dpl, 6° LU, 43° LS, 106°, 48,32 BT. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2010 sampai Juni 2011.

Pengaruh Varietas Kedelai, Mulsa Jerami dan PGPR. Percobaan pengaruh varietas, mulsa jerami dan PGPR di lapangan dilakukan dalam Rancangan Acak Kelompok Faktorial yang terdiri dari 3 faktor perlakuan yaitu Varietas [Anjasmoro (V_1) dan Gepak Kuning (V_2)]; Mulsa Jerami [Dengan mulsa jerami (M_1) dan Tanpa mulsa jerami (M_2)]; PGPR [Dengan PGPR (P_1) dan Tanpa PGPR (P_2)], masing-masing 2 taraf perlakuan, dan 3 kali ulangan.

Lahan percobaan yang terletak di Desa Ciburuy, Kecamatan Cigombong, Sukabumi, seluas 1344 m² dibagi menjadi 24 petakan berukuran masing-masing 8 x 8 m. Di dalam petak dibuat 8 guludan dengan ukuran 0,7 x 8 m dan jarak antar guludan 0,3 m. Tiap guludan dibuat 2 baris tanaman dengan jarak 40 cm.

Varietas kedelai (Anjasmoro dan Gepak Kuning) sebagai faktor perlakuan pertama masing-masing ditanam dengan jarak tanam 20 x 20 cm. Setiap lubang tanam diisi 2 butir benih. Di samping guludan dibuat parit kecil untuk alur pupuk NPK dengan komposisi 1:1:1. Pemberian mulsa jerami padi sebagai faktor perlakuan kedua dilakukan setelah penanaman. Jerami dipasang menutupi seluruh permukaan tanah. Perlakuan biokontrol yang merupakan formulasi antara bakteri *B. subtilis* AB 89 dan *P. fluorescens* RH4003 (Nawangsih 2006) diberikan 2 minggu setelah tanam. Formulasi dibuat dari biakan *B. subtilis* AB89 dan *P. fluorescens* RH4003 yang dipanen kemudian disuspensikan kedalam 1000 ml medium LB, dihomogenkan dengan inkubator bergoyang selama 24 jam. Aplikasi dilakukan dengan cara menyiramkan 50 ml suspensi (konsentrasi 10⁷-10⁸ cfu/ml) di sekitar perakaran tanaman kedelai.

Kelimpahan Bakteri Kitinolitik, Tahan Panas dan Fluorescence. Tanah diambil dari rizosfer tanaman sampel pada lahan percobaan dengan kedalaman \pm 10 cm. Pengambilan dilakukan menggunakan metode pengambilan sampel huruf S (Gambar 1). Sampel tanah

diambil saat tanaman berumur 6 minggu setelah tanam (MST) pada fase pembungaan. Pengambilan sampel tanah dilakukan untuk mengetahui kelimpahan dan keragaman bakteri kitinolitik, tahan panas, dan kelompok fluorescence.

Isolasi bakteri untuk penghitungan kelimpahan bakteri kitinolitik, tahan panas, dan kelompok fluorescence dilakukan dengan teknik pengenceran dan pencawanan. Sebanyak 20 g tanah perakaran diambil dari masing-masing 10 tanaman sampel secara acak dari setiap perlakuan. Sampel tersebut kemudian disatukan dan sebanyak 10 g diambil untuk selanjutnya disuspensikan dalam 90 ml akuades steril. Setelah dilakukan pengenceran berseri, sebanyak 0,1 ml (100 µl) dari masing-masing pengenceran disebar (*plating*) dengan menggunakan *glass beads* (diameter 0,5 mm) pada media kitin (meat extract 10 g/l, peptone 10 g/l, NaCl 1,5 g/l, Agar 15 g/l, ditambah dengan 0,2% koloidal kitin) untuk mengisolasi bakteri kitinolitik, media KBA (proteose peptone 20g/l, glycerol 10 g/l, K₂HPO₄ 1,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,5 g/l, agar 20 g/l, pH 7,2) untuk mengisolasi bakteri kelompok fluorescence dan media TSA (pancreatic digest of casein 15 g/l, papaic digest of soybean meal 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l, pH 7,3) untuk mengisolasi bakteri tahan panas. Media dibuat berdasarkan formula yang ditulis oleh Atlas (2005). Khusus untuk media TSA, pencawanan dilakukan setelah suspensi sampel tanah dipanaskan pada suhu 80°C (15 menit). Media cawan yang sudah diinokulasi kemudian diinkubasikan pada suhu ruang (28°C) selama 2 hari dan dihitung jumlah koloni serta jenis bakteri yang tumbuh.

Karakterisasi Isolat Bakteri Rizosfer. Karakterisasi isolat bakteri rizosfer secara umum dilakukan berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Schaad (2001). Karakterisasi yang dilakukan meliputi morfologi

koloni (bentuk, warna, elevasi), reaksi Gram, Reaksi Hipersensitif (HR), fluoresensi, hidrolisa kitin (sangat kuat : diameter zona bening > 2 cm, kuat : diameter zona bening 1,5-2 cm, sedang: diameter zona bening 0,5-1,5 cm, rendah: diameter zona bening < 0,5 cm), pembentukan endospora, hemolisis darah (Yeh *et al.*, 2009), dan uji LOPAT (*Levan, Oksidase, Potato Soft Rot, Arginine, Tobacco Hypersensitive*) (Schaad, 2001).

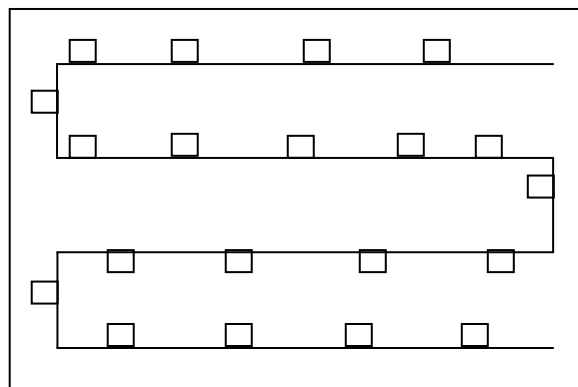
Uji Penghambatan Miselia *Sclerotium rolfsii* oleh Bakteri Rizosfer Kedelai. Inokulum cendawan *S. rolfsii* yang digunakan merupakan hasil isolasi dari tanaman kedelai yang terserang patogen tersebut. Uji penghambatan dilakukan dengan cara menumbuhkan patogen dan kandidat agen biokontrol dalam satu cawan Petri berisi media PDA. Potongan agar berdiameter 0,5 cm yang sudah ditumbuhi miselia cendawan diletakkan pada permukaan media PDA dalam cawan Petri berdiameter 9 cm dengan jarak ± 3 cm dari tepi cawan. Selanjutnya satu loop bakteri rizosfer atau akuades steril (sebagai kontrol) digoreskan berseberangan dengan cendawan dengan jarak ± 3 cm (Gambar 2). Persentase penghambatan dihitung dengan rumus yang dilaporkan oleh Ganesan *et al.* (2007) dengan modifikasi:

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

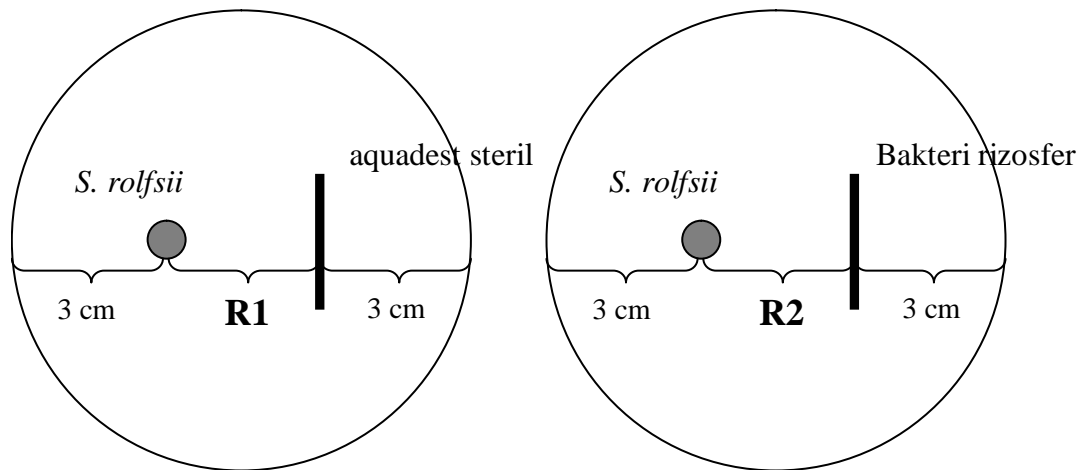
R1 = lebar miselia *S. rolfsii* ke arah goresan aquades steril (kontrol)

R2 = lebar miselia *S. rolfsii* ke arah bakteri rizosfer

Percobaan *in vitro* dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 3 ulangan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SAS versi 9.1.3. Perlakuan yang berbeda nyata diuji



Gambar 1. Metode pengambilan sampel dengan pola S



Gambar 2. Tata letak cendawan patogen dan bakteri rizosfer dalam pengujian penghambatan melalui mekanisme antibiosis

lanjut dengan uji selang berganda Duncan pada taraf nyata 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

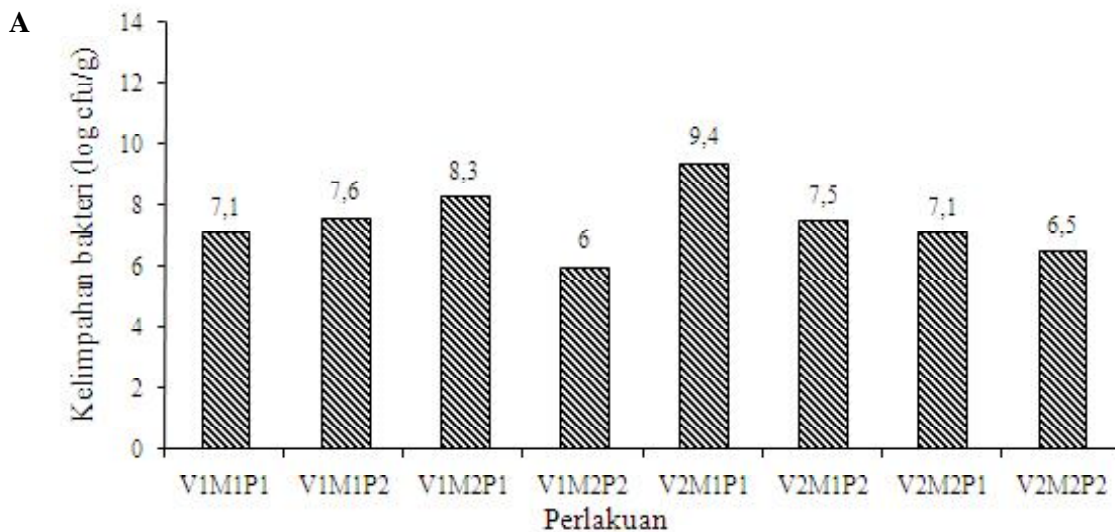
Kelimpahan Bakteri Rizosfer. Kelimpahan empat kelompok bakteri yang diamati pada masing-masing perlakuan percobaan sistem PHT-biointensif disajikan dalam Gambar 3. Pada gambar tersebut terlihat bahwa pada masing-masing perlakuan, bakteri tahan panas memiliki kelimpahan paling tinggi dengan kisaran 10^{11} - 10^{12} cfu/g tanah, diikuti dengan bakteri non-fluorescence dengan kelimpahan 10^{11} cfu/g tanah, bakteri kitinolitik dengan kisaran 10^6 - 10^9 cfu/g tanah dan bakteri kelompok fluorescence dengan kelimpahan 10^3 - 10^8 cfu/g tanah.

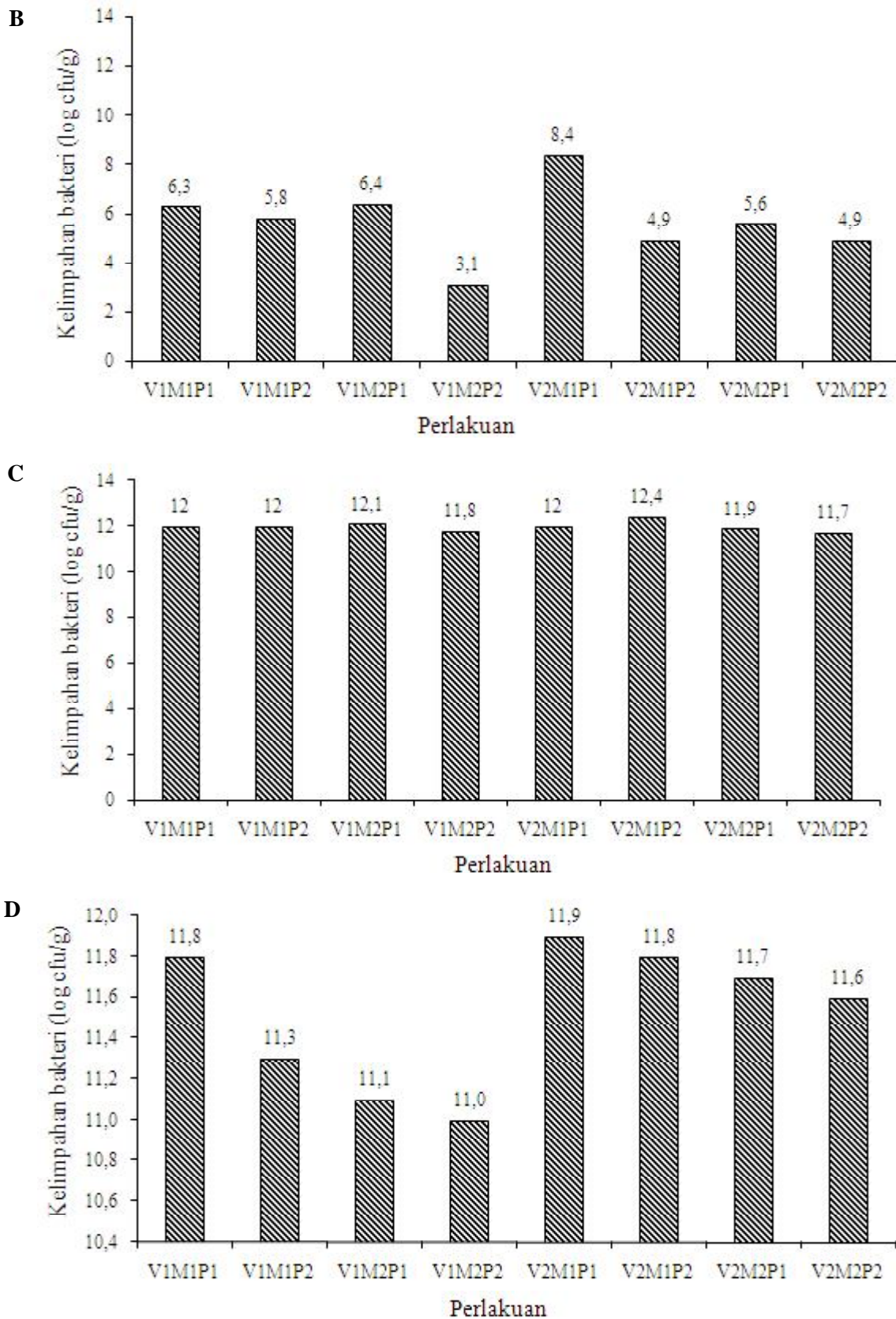
Kombinasi perlakuan varietas, mulsa jerami dan aplikasi PGPR mampu meningkatkan kelimpahan bakteri rizosfer kelompok kitinolitik, tahan panas, fluorescence

dan non-fluorescence dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Menurut Graham (2005), keseimbangan biologi pada rizosfer untuk mengendalikan patogen dapat diciptakan dengan memanipulasi lingkungan yaitu dengan cara integrasi pengendalian hayati dan kultur teknis.

Kombinasi perlakuan varietas Gepak Kuning dengan mulsa jerami dan dengan aplikasi PGPR ($V_2M_1P_1$) menunjukkan nilai kelimpahan bakteri terbesar hampir pada semua kelompok bakteri (Gambar 3). Selain itu diketahui juga bahwa keragaman kelompok bakteri terbanyak terdapat pada kombinasi perlakuan Gepak Kuning yang diberi mulsa jerami dan diaplikasikan PGPR ($V_2M_1P_1$) (Tabel 1). Semakin beragam mikroorganisme dalam tanah maka akan semakin banyak peluang mengendalikan patogen secara biologi.

Hasil isolasi tanah menunjukkan bahwa kelimpahan bakteri rizosfer (kitinolitik, tahan panas,





Gambar 3. Diagram kelimpahan masing-masing kelompok bakteri pada kombinasi perlakuan dibandingkan dengan kontrol pada masing-masing varietas; A= Bakteri kitinolitik, B= Bakteri fluoresence, C= Bakteri tahan panas, D= Bakteri non-fluorescence; V₁= varietas Anjasmoro, V₂= varietas Gepak Kuning; M₁= dengan mulsa jerami; M₂= tanpa mulsa jerami; P₁= dengan PGPR; P₂=tanpa PGPR.

fluorescence dan non-fluorescence) pada petak yang diberi mulsa jerami tidak berbeda dengan tanpa mulsa jerami. Oke & Ologun (2005) menyatakan bahwa mulsa merupakan sumber energi bagi mikroorganisme yang hidup di dalam tanah yang selanjutnya akan didekomposisi dari senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana. Sehingga, hasil dekomposisi dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman. Dalam penelitian ini ternyata hasilnya berbeda, kemungkinan jerami yang digunakan masih belum terdekomposisi secara menyeluruh sehingga belum dapat dimanfaatkan oleh bakteri yang ada.

Aktivitas Penghambatan Bakteri Rizosfer terhadap *S. rolfisii*. Persentase penghambatan miselia *S. rolfisii* oleh masing-masing isolat bakteri rizosfer kedelai disajikan dalam Tabel 2, sedangkan contoh bentuk penghambatan disajikan dalam Gambar 4. Pada masing-masing kelompok bakteri ditemukan satu isolat yang menghasilkan persentase penghambatan tertinggi. Untuk kelompok bakteri tahan panas (TP), bakteri non-fluorescence (NF), bakteri kitinolitik (KT) dan bakteri fluorescence (F), penghambatan tertinggi masing-masing dihasilkan oleh isolat TP32 (95,6%), NF10 (85,8%), KT4 (80,5%) dan F8 (45,0%). Secara keseluruhan, isolat bakteri tahan panas TP32 mampu menghasilkan persentase penghambatan tertinggi. Paramageetham & Babu (2012) melaporkan bahwa bakteri *Pseudomonas* kelompok fluorescence isolat PSTPT 13 yang diisolasi dari hutan mampu menghambat pertumbuhan *S. rolfisii in vitro* hingga 75% dengan memproduksi HCN, siderofor dan enzim protease. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan kemampuan isolat bakteri kelompok fluorescence yang berhasil diisolasi dalam penelitian ini.

Karakterisasi Beberapa Isolat Terpilih

Bakteri Tahan Panas. Berdasarkan perbedaan morfologi koloni, lima isolat bakteri tahan panas yang paling banyak ditemukan saat isolasi adalah TP31, TP42, TP48, TP61 dan TP70, yang selanjutnya diuji pembentukan sporanya. Hasil pengujian produksi endospora terhadap isolat-isolat tersebut disajikan dalam Tabel 3.

Menurut Pelczar & Chan (1986), endospora berfungsi sebagai struktur bertahan. Dibandingkan dengan sel vegetatif, endospora sangat resisten terhadap kondisi-kondisi fisik yang kurang menguntungkan seperti suhu tinggi dan kekeringan juga terhadap bahan-bahan kimia seperti desinfektan. Hasil pengamatan diketahui posisi endospora dapat terletak ditengah dan didekat ujung sel. Menurut Salle (1973), masing-masing spesies *Bacillus* memiliki karakteristik tersendiri baik ukuran, bentuk dan posisi spora walaupun variasi ini bisa berubah dalam lingkungan yang berbeda.

Berdasarkan hasil pengujian karakter hemolisis diketahui bahwa *B. subtilis* AB89 menunjukkan reaksi lisis yang bersifat β -hemolisis (Gambar 4) dan 3 isolat lain yang menunjukkan reaksi yang sama dengan *B. subtilis* AB89 yaitu isolat TP42, TP48 dan TP70 (Tabel 4). Yeh *et al.* (2009) menyatakan bahwa ada tiga tipe hemolisis, yaitu: (1) Alfa hemolisis (α -hemolisis) yang artinya terjadi lisis parsial sehingga media di sekeliling koloni berwarna abu-abu kehijauan, (2) Beta hemolisis (β -hemolisis) yang artinya darah secara lengkap dilisis oleh mikroba sehingga media di sekeliling koloni menjadi tidak berwarna atau bening, dan (3) Gamma hemolisis (γ -hemolisis) yang artinya tidak terjadi lisis oleh mikroba sehingga tidak terjadi perubahan warna pada media.

Tabel 1. Pengaruh varietas, mulsa jerami dan aplikasi PGPR terhadap keanekaragaman bakteri rizosfer (kelompok kitinolitik, tahan panas, non-fluorescence dan fluorescence)

Perlakuan	Jumlah jenis bakteri				Total
	Tahan panas	Kitinolitik	Fluorescence	Non-fluorescence	
V ₁ M ₁ P ₁	15	3	1	10	29
V ₁ M ₁ P ₂	5	7	1	9	22
V ₂ M ₁ P ₁	20	12	3	14	49
V ₂ M ₁ P ₂	7	19	1	11	38
V ₁ M ₂ P ₁	4	7	1	4	16
V ₁ M ₂ P ₂	10	9	2	3	24
V ₂ M ₂ P ₁	6	6	1	6	19
V ₂ M ₂ P ₂	4	3	1	6	14

V₁: varietas Anjasmoro; V₂: varietas Gepak Kuning; M₁: dengan mulsa jerami; M₂: tanpa mulsa jerami; P₁: dengan PGPR; P₂: tanpa PGPR

Tabel 2. Rerata persentase penghambatan isolat-isolat bakteri tahan panas, non-fluorescence, kitinolitik dan fluorescence terhadap *S. rolfsii* secara *in vitro*

No.	Penghambatan terhadap <i>S. rolfsii</i> ^{*)}							
	Bakteri tahan panas (TP)		Bakteri non-fluorescence (NF)		Bakteri kitinolitik (KT)		Bakteri fluorescence (F)	
	Kode isolat	%	Kode isolat	%	Kode isolat	%	Kode isolat	%
1	TP1	63,4 ab	NF1	60,0 ab	KT1	50,4b a	F1	28,5 ab
2	TP2	60,4 ab	NF2	30,0 ab	KT2	60,0 ab	F2	36,6 ab
3	TP3	75,5 ab	NF3	60,0 ab	KT3	55,3 ab	F3	37,5 ab
4	TP4	66,2 ab	NF4	30,0 ab	KT4	80,5 a	F4	36,8 ab
5	TP5	76,6 ab	NF5	26,6 ab	KT5	60,3 ab	F5	41,0 ab
6	TP6	60,0 ab	NF6	40,4 ab	KT6	55,5 ab	F6	37,5 ab
7	TP7	75,0 ab	NF7	65,5 ab	KT7	60,6 ab	F7	34,7 ab
8	TP8	66,5 ab	NF8	45,0 ab	KT8	50,0 ab	F8	45,0 a
9	TP9	25,5 b	NF9	75,5 ab	KT9	51,0 ab	F9	18,0 ab
10	TP10	45,3 ab	NF10	85,8 a	KT10	50,5 ab	F10	34,5 ab
11	TP11	35,9 ab	NF11	80,5 ab	KT11	34,0 ab	K	0,0 b
12	TP12	55,3 ab	NF12	75,0 ab	KT12	31,5 ab	-	-
13	TP13	40,5 ab	NF13	25,9 ab	KT13	31,2 ab	-	-
14	TP14	35,8 ab	NF14	35,0 ab	KT14	32,3 ab	-	-
15	TP15	50,4 ab	NF15	60,3 ab	KT15	80,0 ab	-	-
16	TP16	30,5 ab	NF16	75,4 ab	KT16	50,0 ab	-	-
17	TP17	46,6 ab	NF17	40,3 ab	KT17	33,2 ab	-	-
18	TP18	55,0 ab	NF18	35,5 ab	KT18	30,9 ab	-	-
19	TP19	90,3 ab	NF19	60,5 ab	KT19	40,1 ab	-	-
20	TP20	65,9 ab	NF20	25,7 ab	KT20	70,0 ab	-	-
21	TP21	80,0 ab	K	0,0 b	KT21	31,4 ab	-	-
22	TP22	65,3 ab	-	-	K	0,0 b	-	-
23	TP23	45,5 ab	-	-	-	-	-	-
24	TP24	40,5 ab	-	-	-	-	-	-
25	TP25	60,6 ab	-	-	-	-	-	-
26	TP26	75,0 ab	-	-	-	-	-	-
27	TP27	75,0 ab	-	-	-	-	-	-
28	TP28	75,4 ab	-	-	-	-	-	-
29	TP29	70,5 ab	-	-	-	-	-	-
30	TP30	45,4 ab	-	-	-	-	-	-
31	TP31	45,4 ab	-	-	-	-	-	-
32	TP32	95,6 a	-	-	-	-	-	-
33	TP33	60,0 ab	-	-	-	-	-	-
34	TP34	85,0 ab	-	-	-	-	-	-
35	TP35	85,0 ab	-	-	-	-	-	-
36	TP36	65,0 ab	-	-	-	-	-	-
37	TP37	85,0 ab	-	-	-	-	-	-
38	TP38	40,0 ab	-	-	-	-	-	-
39	TP39	75,0 ab	-	-	-	-	-	-
40	TP40	80,0 ab	-	-	-	-	-	-
41	TP41	75,0 ab	-	-	-	-	-	-
42	TP42	55,8 ab	-	-	-	-	-	-

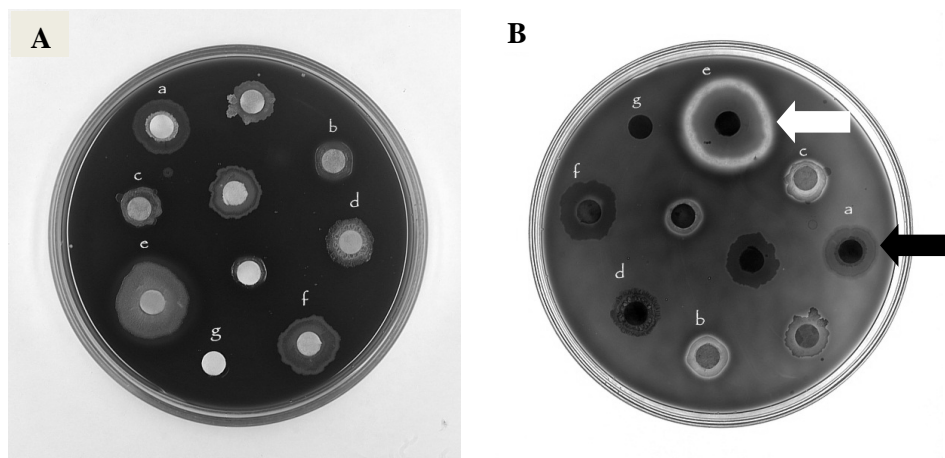
Tabel 2. *lanjutan*

No.	Bakteri tahan panas (TP)		Penghambatan terhadap <i>S. rolfsii</i> [*])					
			Bakteri non-fluorescence (NF)		Bakteri kitinolitik (KT)		Bakteri fluorescence (F)	
	Kode isolat	%	Kode isolat	%	Kode isolat	%	Kode isolat	%
43	TP43	35,4 ab	-	-	-	-	-	-
44	TP44	25,5 b	-	-	-	-	-	-
45	TP45	80,7 ab	-	-	-	-	-	-
46	TP46	75,0 ab	-	-	-	-	-	-
47	TP47	75,0 ab	-	-	-	-	-	-
48	TP48	80,7 ab	-	-	-	-	-	-
49	TP49	80,0 ab	-	-	-	-	-	-
50	TP50	30,5 ab	-	-	-	-	-	-
51	TP51	80,0 ab	-	-	-	-	-	-
52	TP52	85,0 ab	-	-	-	-	-	-
53	TP53	80,0 ab	-	-	-	-	-	-
54	TP54	85,6 ab	-	-	-	-	-	-
55	K	0,0 b	-	-	-	-	-	-

* Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%.

Tabel 3. Keberadaan dan posisi endospora pada isolat bakteri tahan panas terbanyak

No	Kode isolat	Ada/tidaknya endospora	Posisi endospora
1	TP31	Ada	Dekat ujung
2	TP42	Ada	Dekat ujung
3	TP48	Ada	Tengah
4	TP61	Ada	Tengah
5	TP70	Ada	Dekat ujung
6	<i>B. subtilis</i> AB89	Ada	Dekat ujung



Gambar 4. Reaksi hemolisis pada agar darah isolat bakteri tahan panas terpilih (tampak depan) (A); Reaksi hemolisis pada agar darah isolat bakteri tahan panas terpilih (tampak belakang) (B); a)TP31, b) TP42, c) TP48, d) T61, e) TP70, f) *B. subtilis* AB89, g) kontrol (LB); γ -hemolisis (tanda panah hitam), β -hemolisis (tanda panah putih).

Tabel 4. Reaksi hemolisis isolat terbanyak kelompok tahan panas pada medium agar darah

No	Kode isolat	Sifat lisis	Keterangan
1	TP31	γ -hemolisis	tidak ada perubahan warna
2	TP42	β -hemolisis	terlisis sempurna, warna lisis bening
3	TP48	β -hemolisis	terlisis sempurna, warna lisis bening
4	TP61	γ -hemolisis	tidak ada perubahan warna
5	TP70	β -hemolisis	terlisis sempurna, warna lisis bening
6	<i>B. subtilis</i> AB89	β -hemolisis	terlisis sempurna, warna lisis bening

Hasil uji endospora dan uji pada medium agar darah menunjukkan bahwa isolat TP42, TP48 dan TP70 memiliki kesamaan dengan isolat *B. subtilis* AB89. Namun berdasarkan morfologi koloni terdapat perbedaan antara isolat TP42, TP48 dan TP70 dengan isolat *B. subtilis* AB89 (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut diduga bukan merupakan *B. subtilis* AB89. Isolat-isolat bakteri tersebut merupakan bakteri indigenus yang sudah ada di dalam tanah. Isolat yang memiliki kemiripan morfologi koloni dengan *B. subtilis* yang diaplikasikan adalah TP32. Isolat TP32 populasinya relatif lebih sedikit dibandingkan dengan kelima isolat tersebut tetapi masih memiliki kemampuan penghambatan *in vitro* paling tinggi.

Bakteri Fluorescence. Isolat yang banyak ditemukan pada bakteri kelompok fluorescence adalah F3, F4, F7, F9 dan F11. Hasil uji LOPAT menunjukkan bahwa hanya isolat F9 yang berbeda dengan bakteri PGPR yang diaplikasikan (*P. fluorescens* RH4003). Isolat lainnya menunjukkan karakter yang sama dengan bakteri PGPR yang diaplikasikan (Tabel 6).

Dari hasil semua pengujian karakter pada kelompok fluorescence diketahui bahwa hampir semua isolat bakteri yang diuji menunjukkan karakteristik yang sama dengan bakteri PGPR yang diaplikasikan yaitu *P. fluorescens* RH4003, kecuali isolat F9. Berdasarkan karakter morfologi koloni isolat yang mirip dengan *P. fluorescens* RH4003 adalah isolat F4 dan F7, yaitu:

Tabel 5. Deskripsi karakter morfologi isolat TP42, TP48, TP70 dan *B. subtilis* AB89

Kode Isolat	Bentuk	Warna	Tepian	Elevasi	Berlendir/Tidak
TP42	bundar	putih kusam	licin	cembung	tidak
TP48	bundar	putih kusam	berombak	cembung	tidak
TP70	bundar	putih kusam	seperti benang	timbul	tidak
<i>B.subtilis</i> AB89	bundar	putih kusam	berombak	datar	tidak

Tabel 6. Hasil uji LOPAT isolat-isolat yang paling banyak ditemukan dalam kelompok fluorescence

Kode isolat	Uji LOPAT					
	Levan	Oksidase	<i>Potato Soft rot</i>	Arginin		<i>Tobacco hypersensitive (HR)</i>
				Non-parafin	Ber-parafin	
F3	+	+	-	+	+	-
F4	+	+	-	+	+	-
F7	+	+	-	+	+	-
F9	-	-	+	-	-	-
F11	+	+	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> RH4003	+	+	-	+	+	-

koloni berbentuk bulat, tepian licin, warna putih susu, elevasi cembung. Isolat F9 memiliki koloni berbentuk bulat, tepian licin, warna putih agak bening, elevasi datar. Semua isolat tersebut menunjukkan fluoresensi (koloni berpendar warna hijau kebiruan) pada medium King's B agar di bawah sinar ultra violet.

Bakteri Kitinolitik. Berdasarkan hasil pengujian diketahui 5 isolat bakteri kitinolitik dengan populasi terbanyak adalah: KT17, KT21, KT29, KT31 dan KT37. Aktivitas kitinolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni. Isolat bakteri kitinolitik KT17 mempunyai aktivitas kitinolitik yang sangat kuat ditunjukkan dengan lebar zone bening yang mencapai 2,1 cm. Bakteri penghasil enzim kitinolitik banyak terdapat pada habitat yang memiliki kandungan kitin tinggi, seperti kompos yang mengandung kitin (Sakai *et al.*, 1998), eksoskeleton crustaceae (Vogan *et al.*, 2002), air laut, sedimen laut (Brzezinska & Donderski 2001) dan dalam tanah (Chernin *et al.*, 1998)

Patil (2004) menyatakan bahwa enzim kitinolitik merupakan enzim ekstraseluler untuk pengambilan nutrisi dan parasitisme. Brzezinska & Donderski (2001) dan Thompson *et al.* (2001) menambahkan, bakteri memproduksi enzim kitinolitik untuk mendegradasi kitin sehingga memperoleh N-asetilglukosamin sebagai nutrisi karbon dan nitrogen untuk proses hidup bakteri. Menurut Metcalfe *et al.* (2002), peranan bakteri kitinolitik penting dalam mempertahankan siklus karbon dan nitrogen dari degradasi kitin dalam ekosistem. Hasil isolasi kelompok bakteri ini dapat dijadikan koleksi untuk kemudian dapat dijadikan calon agens antagonis untuk penyakit-penyakit pada kedelai.

SIMPULAN

Penanaman varietas Gepak Kuning dengan mulsa dan aplikasi PGPR ternyata dapat meningkatkan kelimpahan bakteri rizosfer pada tanaman kedelai. Perlakuan yang diaplikasikan dalam sistem penanaman relatif lebih berpengaruh terhadap kelimpahan bakteri kitinolitik dan fluorescence dibandingkan dengan bakteri tahan panas dan non-fluorescence. Sebanyak 17 isolat bakteri (TP19, TP21, TP32, TP34, TP35, TP37, TP40, TP45, TP49, TP51, TP52, TP53, TP54, NF10, NF11, KT4 dan KT15) yang berhasil diisolasi dari rizosfer kedelai mampu menghambat pertumbuhan miselia cendawan *S. rolfisii* secara *in vitro* lebih dari 80%, sehingga berpotensi untuk menjadi agen biokontrol.

SANWACANA

Penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan penelitian IMHERE B2C-IPB Tahun 2010 dengan judul kegiatan "Penelitian Komponen dan Teknologi Penunjang Pelaksanaan Pengendalian Hama Terpadu Biointensif".

DAFTAR PUSTAKA

- Arwiyanto T, Sudarmadi, & Hartana I. 1999. Deteksi strain *Pseudomonas solanacearum* penghasil bakteriosin. *J. Perlindungan Indonesia*. 2(2): 60–65.
- Atlas RM. 2005. Handbook of Media for Environmental Microbiology, 2nd Edition. USA: CRC Press.
- Baker KF & Cook RJ. 1983. *Biological Control of Plant Pathogen*. Freeman and Co, San Fransisco, California.
- Bolan NS. 1991. A critical review of the role of mycorrhizae fungi in the uptake of phosphorus by plants. *J. Plant and Soil* 134: 189–207.
- Brzezinska MS & Donderski W. 2001. Occurance and activity of the chitinolytic bacteria of *Aeromonas* genus. *Polish J. Enviro Studies* 10(1): 27–31.
- Chernin LS, Michael KW, Jacquelyn MT, Shoshan H, Barrie WB, Cheat W, Gordon SAB, & Stewart. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.* 180: 4435–4441.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, & Barka EA. 2005. Mini review: Use of plant growth-promoting rhizobacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mecanisms of action and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951–4959.
- Ganesan S, Kuppasamy RG, & Sekar R. 2007. Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfisii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using rhizobium and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). *Turk. J. Agric. For.* 31(2): 103–108.
- Gao JMW, Bauer KR, Shockley MA, Pysz RM., & Kelly. 2003. Growth of Hiperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases. *J. Appl. Environ Microbiol.* 69: 319–328.

- Graham J. 2005. *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens and Nematodes* 2nd Ed. Pearson Education Inc. New Jersey.
- Mariani. 1995. Isolasi dan seleksi bakteri filusfer yang berpotensi untuk biokontrol *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8 Ra pada tanaman kedelai dengan esei nukleasi es. Bogor: Jurusan Biologi, Fakultas MIPA IPB.
- Metcalf AC, Krsek M, Gooday GW, Prosser JI, & Wellington EM. 2002. Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 5042–5050.
- Mishra DS, Gupta AK, Prajapati CR, & Singh US. 2011. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. *Pak. J. Bot.* 43(5): 2569–2574.
- Nawangsih AA. 2006. Seleksi dan karakterisasi bakteri biokontrol untuk mengendalikan penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tomat. [Disertasi]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Oke DO & Ologun. 2005. Effect of mulch from four agroforestry species on the moisture content, temperature and microbial population in a humid tropical soil. *J. Microbiol Scie* 5(3): 326-329.
- Paramageetham CH & Babu GP. 2012. Antagonistic activity of fluorescent Pseudomonads against a polyphagous soil borne plant pathogen – *Sclerotium rolfsii*. 1(9): 436. Doi:10.4172/scientificreports.436.
- Patil NN, Nawani NN, Thakkar AP, & Kapadnis BP. 2004: Diversity of chitinolytic systems of bacteria. In: *Biotechnological approaches for sustainable development*. India: Allied Publishers.
- Pelczar MJ Jr & Chan ECS. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Volume ke-1,2. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, penerjemah. Jakarta :UI Pr; 1986. Terjemahan dari: *Elements of Microbiology*.
- Pleban S, Chemin L, & Chet I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett. J. Appl. Microbiol.* 25(4): 284–288.
- Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, Wakayama M, & Moriguchi M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3397–3402.
- Salle AJ. 1973. *Fundamental Principles of Bacteriology*. 7th edition. Tata McGraw-Hill Publishing Company. New Delhi.
- Schaad NW. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* 3rd Ed. Minnesota: APS Press. St. Paul.
- Sudjono MS. 1997. *Karakteristik Mikroba Penghasil Kitinase dan Kloning Gen Kitinase dan gen Cry dari Mikroba di Indonesia*. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor.
- Thompson SE, Smith M, Wilkinson MC, & Peek K. 2001. Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9): 4001–4008.
- Vogan CL, Costa RC, & Rowley AF. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, cancer pagurus – isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *J. Microbiol.* 148: 743–754.
- Wang SL & Chang WT. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/ lisozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in shrimp and scrab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 380–386.
- Wartono. 2010. Studi Keefektifan Formulasi Spora *Bacillus subtilis* sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit Hawar Daun Bakteri dan Hawar Pelepah Serta Pemicu Pertumbuhan pada Tanaman Padi [Tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wu ML, Chuang YC, Chen JP, Chen CS, & Chang MC. 2001. Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 5100-5106.
- Yeh E, Pinsky BA, Banaei N, & Baron EJ. 2009. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *J. Med.* 4(7): 6141.