



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTERISASI DAN APLIKASI BAKTERI AGEN BIOKONTROL:
Bacillus sp. 140-B DAN *Streptomyces* sp. L.3.1-DW TERHADAP KAPANG
PATOGEN *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* PADA TANAMAN
PISANG (*Musa acuminata*) var. CAVENDISH**

TESIS

**NUR LAILI
1006786410**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCA SARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTERISASI DAN APLIKASI BAKTERI AGEN BIOKONTROL:
Bacillus sp. 140-B DAN *Streptomyces* sp. L.3.1-DW TERHADAP KAPANG
PATOGEN *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* PADA TANAMAN
PISANG (*Musa acuminata*) var. CAVENDISH**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains**

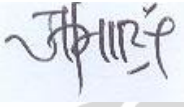
**NUR LAILI
1006786410**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCA SARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2012**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Nur Laili
NPM : 1006786410
Tanda tangan : 
Tanggal : 02 Juli 2012

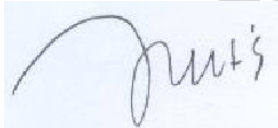


Judul : Karakterisasi dan Aplikasi Bakteri Agen Biokontrol:
Bacillus sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW
terhadap Kapang Patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht
f. sp. *cubense* pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata*)
var. Cavendish

Nama : Nur Laili
NPM : 1006786410

MENYETUJUI:

1. Komisi Pembimbing



Dr. rer. nat. Sarjiya Antonius

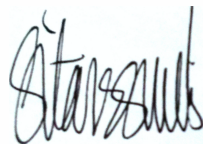
Pembimbing I



Dr. Andi Salamah, M.Sc.

Pembimbing II

2. Komisi Penguji



Dra. Sitaresmi, M.Sc.

Penguji I



Dr. Nisyawati, M.S.

Penguji II

**3. Ketua Program Studi Biologi
Program Pascasarjana FMIPA**



Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M. Biomed.

**4. Ketua Program Pascasarjana
FMIPA UI**



Dr. Adi Basukriadi, M.Sc.

Tanggal Lulus: 02 Juli 2012

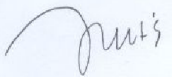

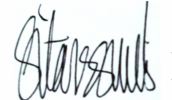

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Nur Laili
NPM : 1006786410
Program Studi : Mikrobiologi
Judul Tesis : Karakterisasi dan Aplikasi Bakteri Agen Biokontrol:
Bacillus sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW
terhadap Kapang Patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht
f. sp. *cubense* pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata*)
var. Cavendish

Telah berhasil saya pertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr.rer.nat. Sarjiya Antonius ()
Pembimbing II : Dr. Andi Salamah, M.Sc. ()
Penguji : Dra. Sitaresmi, M.Sc. ()
Penguji : Dr. Nisyawati, M.S. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 02 Juli 2012

**HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nur Laili
NPM : 1006786410
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Tesis

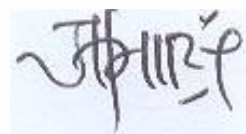
Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dan Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Karakterisasi dan Aplikasi Bakteri Agen Biokontrol: *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW terhadap Kapang Patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata*) var. Cavendish

Beserta perangkatnya yang ada jika diperlukan. Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini LIPI dan Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di: Depok
Pada tanggal: 02 Juli 2012
Yang menyatakan



(Nur Laili)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas berkat dan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **Karakterisasi dan Aplikasi Bakteri Agen Biokontrol: *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW terhadap kapang patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata*) var. Cavendish**. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam meraih gelar Magister Sains Program Studi Biologi program Pascasarjana, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.

Dalam menyelesaikan tesis ini, penulis banyak menerima bantuan, dukungan dan kerjasama yang baik dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.rer.nat. Sarjiya Antonius dan Dr. Andi Salamah, selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran dan tenaga untuk membimbing dan mengarahkan penelitian yang dikerjakan penulis. Kedua pembimbing telah banyak memberikan tambahan ilmu dan pengetahuan yang berkaitan dengan penelitian ini.
2. Dra. Sitaresmi, M.Sc. dan Dr. Nisyawati, M.S. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak saran dan koreksinya demi perbaikan tesis ini.
3. Kementrian Riset dan Teknologi yang telah memberikan beasiswa untuk perkuliahan dan penelitian ini.
4. Proyek DIPA-Kompetitif LIPI Tahun Anggaran 2010-2011 dan 2011-2012, yang telah memberikan dana bagi terlaksananya penelitian ini.
5. PT. Nusantara Tropical Fruit (NTF), Lampung Timur yang telah memberikan bibit tanaman pisang Cavendish untuk bahan studi pendahuluan awal penelitian.
6. Laboratorium Kultur Jaringan Seamo Biotrop, Bogor yang telah menyediakan bibit tanaman pisang Cavendish untuk penelitian ini.
7. Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M. Biomed. selaku ketua Program Studi Biologi, Program Pascasarjana, FMIPA, UI dan pembimbing akademik yang telah banyak memberikan pengarahan kepada penulis.

8. Mbak Evy Setiawati dan mbak Fenti yang telah banyak membantu urusan administrasi dalam pengerjaan penelitian.
9. Suami tercinta Ridho Anggoro Kusumo Adhi, untuk semua do'a, kasih sayang, semangat, perhatian dan pengertiannya, yang tak pernah lelah memberikan yang terbaik untukku (Thanks for *GT-N7000*, love it!!!) *let set the world brighter than the sun...* Semangat!!!
10. Kedua orang tua, mertua, kakak dan adikku tercinta, untuk semua do'a, perhatian dan pengertiannya kepada penulis.
11. Tim proyek DIPA-Kompetitif LIPI, Dra. Dwi Agustiyani, M. Eng., Ir. Suciatmih, M.Si. dan Iman Hidayat, Ph.D., atas bantuan, diskusi dan kerjasamanya dalam penelitian ini.
12. Tim rumah kaca Mikrobiologi, Bapak Entis Sutisna dan Bapak Mulyadi, yang telah banyak membantu dalam pengerjaan penelitian di rumah kaca.
13. Anggota Laboratorium Ekofisiologi Mikrobiologi Puslit Biologi LIPI, Ibu Dra. Hartati Imamuddin, Tirta, Teh Nani, Ibu Ety, mbak Arie dan Astri yang telah banyak membantu persiapan penelitian di laboratorium.
14. Sahabat-sahabat dan teman-teman di bidang Mikrobiologi Puslit Biologi LIPI serta teman-teman Pascasarjana Biologi UI, yang telah meluangkan waktunya untuk berdiskusi dalam penelitian dan penulisan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tesis yang telah disusun belum sempurna, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak. Penulis juga berharap hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak dan bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 02 Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
SUMMARY	xvi
PENGANTAR PARIPURNA	1
MAKALAH I: KARAKTERISASI AKTIVITAS ANTAGONISME DARI <i>Bacillus</i> sp. 140-B DAN <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW DAN POTENSINYA SEBAGAI AGEN BIOKONTROL TERHADAP KAPANG PATOGEN <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht f. sp. <i>cubense</i> SECARA <i>IN-VITRO</i>	4
Abstract	4
Pendahuluan	5
Bahan dan Cara Kerja	7
Hasil dan Pembahasan	12
Kesimpulan	27
Saran	27
Daftar Acuan	28
MAKALAH II: APLIKASI <i>Bacillus</i> sp. 140-B DAN <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW UNTUK MENGENDALIKAN INFEKSI <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht f. sp. <i>cubense</i> PADA TANAMAN PISANG (<i>Musa acuminata</i>) var. CAVENDISH	34
Abstract	34
Pendahuluan	35
Bahan dan Cara Kerja	38
Hasil dan Pembahasan	43

Kesimpulan	56
Saran	57
Daftar Acuan	57
DISKUSI PARIPURNA	66
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN	71
DAFTAR ACUAN	73
LAMPIRAN	85



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
I.1. Kurva pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. 140-B pada media NB	13
I.2. Kurva pertumbuhan <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW pada media ISP-2	15
I.3. Hasil uji antagonisme bakteri agen biokontrol terhadap <i>Foc</i> dengan metode <i>cross plug</i> dengan inkubasi selama 5 hari	16
I.4. Hasil uji kualitatif aktivitas enzim protease pada media Protease-Skim Milk Agar 1%	19
I.5. Hasil uji kualitatif aktivitas enzim kitinase pada media Kitin Koloid Agar 0,5%	19
I.6. Aktivitas enzim protease dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. 140-B	22
I.7. Aktivitas enzim protease dan kitinase dari bakteri <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW	23
II.1. Morfologi tanaman pisang di rumah kaca	43
II.2. Persentase infeksi <i>Foc</i> pada tanaman pisang Cavendish	45
II.3. Aktivitas enzim resistensi PAL dan TAL tanaman pisang pada aplikasi agen biokontrol di rumah kaca	49
II.4. Tinggi tanaman pisang Cavendish dengan aplikasi bakteri biokontrol tanpa infeksi <i>Foc</i>	52
II.5. Tinggi tanaman pisang Cavendish dengan aplikasi bakteri biokontrol dan diinfeksi <i>Foc</i>	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman	
I.1	Persentase penghambatan <i>Foc</i> oleh agen biokontrol	17
I.2.	Uji aktivitas enzim protease dan kitinase secara kualitatif	20
I.3.	Aktivitas enzim protease <i>Bacillus</i> sp. 140-B	21
I.4.	Aktivitas enzim protease <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW	22
1.5.	Aktivitas enzim kitinase <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW	22
I.6.	Kadar hormon tumbuh IAA pada bakteri agen biokontrol	26
II.1.	Klasifikasi tingkat infeksi <i>Foc</i> pada tanaman pisang Cavendish	45
II.2.	Populasi <i>Foc</i> di area rizosfer tanaman pisang Cavendish	47
II.3.	Aktivitas enzim PAL dan TAL pada tanaman pisang percobaan aplikasi biokontrol di rumah kaca	50
II.4.	Tinggi tanaman pisang tanpa inokulasi <i>Foc</i>	53
II.5.	Tinggi tanaman pisang yang diinokulasi <i>Foc</i>	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Isolat bakteri <i>Bacillus</i> sp. 140-B dan <i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW dalam media cair	85
2. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) untuk pengukuran kadar protein	85
3. Kurva standar N-Acetyl Glucosamin (NAG) untuk pengukuran aktivitas kitinase	85
4. Kurva standar IAA	86
5. Perendaman bibit tanaman pisang dengan larutan biokontrol	86
6. Morfologi tanaman tanpa inokulasi <i>Foc</i> pada media pasir	86
7. Morfologi tanaman yang diinokulasi <i>Foc</i> pada media pasir	87
8. Kurva standar Trans-Cinamic Acid untuk pengukuran aktivitas PAL	87
9. Kurva standar P-Coumaric Acid untuk pengukuran aktivitas TAL	87
10. Hasil uji ANOVA satu arah pada persentase infeksi <i>Foc</i> pada tanaman pisang Cavendish di rumah kaca	88
11. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada persentase infeksi <i>Foc</i> pada tanaman pisang Cavendish di rumah kaca	88
12. Hasil uji ANOVA satu arah pada populasi <i>Foc</i> di area rizosfer tanaman pisang Cavendish di rumah kaca	90
13. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada populasi <i>Foc</i> di area rizosfer tanaman pisang Cavendish di rumah kaca	91
14. Hasil uji ANOVA satu arah pada aktivitas enzim PAL dan TAL tanaman pisang Cavendish di rumah kaca	93
15. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada aktivitas enzim PAL dan TAL tanaman pisang Cavendish di rumah kaca	94
16. Hasil uji ANOVA satu arah pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang tidak diinokulasi <i>Foc</i>	95
17. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang tidak diinokulasi <i>Foc</i>	96
18. Hasil uji ANOVA satu arah pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang diinokulasi <i>Foc</i>	98
19. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang diinokulasi <i>Foc</i>	99

ABSTRAK

Nama : Nur Laili
Program Studi : Pascasarjana Biologi
Judul Tesis : Karakterisasi dan Aplikasi Bakteri Agen Biokontrol:
Bacillus sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW
terhadap Kapang Patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht f.
sp. *cubense* pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata*) var.
Cavendish

Bacillus sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diisolasi dari tanah dan rizosfer tanaman dari perkebunan nanas dan pisang di Provinsi Lampung. Kedua bakteri tersebut diuji kemampuannya dalam melawan patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (*Foc*) secara *in-vitro* dan *in-vivo*. Aplikasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya secara *in-vivo* pada tanaman pisang var. Cavendish dilakukan dalam rumah kaca selama 30 hari. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi dan menguji potensi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol dalam menghambat patogen *Foc* dan mengkaji kemampuannya untuk menghasilkan enzim ketahanan tanaman pisang. Potensi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol ditunjukkan dengan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan patogen *Foc*, sintesis enzim protease dan kitinase ekstraseluler, produksi hormon tumbuh Indole-Acetic Acid (IAA), dan produksi enzim ketahanan tanaman [phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia lyase (TAL)]. *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW juga berperan sebagai *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR), yang diindikasikan dengan peningkatan pertumbuhan tanaman pisang, di mana perlakuan *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki rata-rata tinggi tanaman tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya, dengan atau tanpa infeksi *Foc*. Hasil penelitian secara *in-vitro* dan *in-vivo* menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol yang lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B. Penelitian ini mengindikasikan bahwa *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengendalikan infeksi *Foc*.

Kata kunci: Aktivitas PAL dan TAL, biokontrol, enzim protease dan kitinase, *Foc*, IAA, PGPR.

ABSTRACT

Name : Nur Laili
Study Programe : Magister Biology
Thesis Title : Characterization and Application of Biocontrol Bacteria Agents: *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW toward Pathogenic Fungi *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubeense* on Banana Plant (*Musa acuminata*) var. Cavendish

Bacillus sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW were isolated from soil and rhizosphere area of pineapple and banana plantation in Lampung Province. Those bacteria were evaluated in-vitro and in-vivo tests against *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubeense* (*Foc*). Application of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as single isolate or in combination in banana plant var. Cavendish were tested under greenhouse conditions for 30 days. The aims of this study were to characterize and investigate the potentials of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as biocontrol agents to inhibit *Foc* pathogen and investigate their abilities to produce plant resistancy enzymes. The potentials of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as biocontrol agents were showed by their abilities to inhibit growth of *Foc* pathogen, synthesise extracellular protease and chitinase enzymes, produce growth hormone, such as Indole-Acetic Acid (IAA), and produce plant resistancy enzymes, such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia lyase (TAL). *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW also act as *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR), that indicated by improvement of banana growth, in which *Streptomyces* L.3.1-DW caused the highest growth of banana either with or without *Foc* infection. In-vitro and in-vivo tests was showed that *Streptomyces* sp. L.3.1-DW had better biocontrol activities compared to *Bacillus* sp. 140-B. This study indicated that *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW could be used as alternative solutions to control *Foc* pathogen.

Keywords: Biocontrol, *Foc*, IAA, PAL and TAL activities, PGPR, protease and chitinase enzymes.

Name : Nur Laili (1006786410)

Date: 02 July 2012

Title : CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF BIOCONTROL BACTERIA AGENTS: *Bacillus* sp. 140-B AND *Streptomyces* sp. L.3.1-DW TOWARD PATHOGENIC FUNGI *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* ON BANANA PLANT (*Musa acuminata*) var. CAVENDISH

Thesis supervisor : Dr.rer.nat. Sarjiya Antonius; Dr. Andi Salamah, M.Sc.

SUMMARY

Fusarium oxysporum Schlecht f. sp. *cubense* (*Foc*) is the causal pathogen of banana wilt or Panama disease. *Foc* has infected banana plantations across Asia, Africa, Australia and tropical regions of America. *Foc* pathogen in Indonesia has been reported to infect banana plantations at 16 provinces, in which three provinces in Sumatera have the largest damage area about 3300 ha. *Foc* infection on banana caused external and internal symptoms. Externally, the first symptoms of disease are wilting and light yellow colouring of the lower leaves, and the first internal symptom was showed by a reddish brown discoloration of the xylem, develops in roots and rhizome.

Biocontrol can be defined as the use of natural organisms or genetically modified, genes or gene products, to reduce the effects of undesirable organisms to favour organisms useful to human, such as crops, trees, animals and beneficial microorganisms. Generally, biocontrol have three mechanisms to inhibit fungal pathogen, 1). competition for nutrients, oxygen and habitat; 2). parasitism or the physical destruction of fungal cell walls by the action of hydrolytic enzymes; and 3). antibiosis activity by antibiotics or antifungal compounds.

Characterization and investigation the potentials of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as biocontrol to inhibit *Foc* pathogen were studied, either *in-vitro* and *in-vivo* test. The potentials of those bacteria as biocontrol agents in *in-vitro* test showed by their abilities to form inhibition zone around pathogen *Foc* on PDA medium, synthesize protease and chitinase enzymes, and

produce growth Hormone, such as Indole Acetic Acid (IAA). Protease and chitinase enzymes was synthesized by biocontrol bacteria are the main mechanism to suppress *Foc* pathogen by cell walls and mycellia degradation through proteolytic and chitinolytic activities. *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW also could produce IAA with variation concentration after 24, 36 and 72 hours incubation. IAA has important roles to control pathogen and promote growth of plant. IAA also function as important signal molecules in the regulation of plant development, increase of plant resistancy by trigger induced systemic resistance (ISR).

Application of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as single isolate or their combination on banana under greenhouse conditions gave a significant effect compared to control. The bacteria showed potential as biocontrol agents, indicated by decreasing % *Foc* infection on banana, suppressing *Foc* population in the rhizosfer area, producing plant resistancy enzymes (PAL and TAL), and promoting growth of banana plants. Penylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL) enzymes are the earliest responses was induced by banana plant againts *Foc* infection. *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW also act as *plant growth-promoting rhizobacteia* (PGPR) to promote plant growth.

The results showed that *Streptomyces* sp. L.3.1-DW had better biocontrol activities compared to *Bacillus* sp. 140-B. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW had larger inhibition zone, produced extracellular protease and chitinase, while *Bacillus* sp. 140-B could only produce extracellular protease, produced higher concentration of IAA, had the lowest % *Foc* infection and *Foc* population, produced higher PAL and TAL activity, and also had higher of banana plant growth. This study indicated that *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW could be used as alternative solutions to control *Fusarium* wilt in banana.

xvii + 100 pages; 12 plates; 11 tables; 19 appendixes

Bibliography : 109 (1981—2012)

PENGANTAR PARIPURNA

Pisang Cavendish merupakan salah satu kultivar pisang yang banyak dibudidayakan pada industri perkebunan karena memiliki beberapa sifat unggul, antara lain rasa, aroma, warna, tekstur serat dan kandungan nutrisinya (Kumar *et al.* 2010). Perkebunan pisang merupakan salah satu usaha perkebunan terpenting di dunia yang terdapat di beberapa negara di wilayah Amerika Latin, Afrika dan Asia (Dita *et al.* 2010). Seiring dengan perkembangan perkebunan pisang, penyakit yang menyerang tanaman pisang juga berkembang dan menjadi permasalahan global yang mengancam kelangsungan produksi pisang. Salah satu penyakit tersebut adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh kapang patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (*Foc*), atau lebih dikenal dengan *Panama disease* (Ploetz 2000; Perez-Vicente 2004; Saravanan *et al.* 2004a; Saravanan *et al.* 2004b; Ploetz 2006; Saravanan & Muthusamy 2006; Dita *et al.* 2010; Jumjunidang *et al.* 2012). Penyakit layu *Fusarium* pada tanaman pisang ditandai dengan beberapa gejala, antara lain: daun menguning dan layu, batang layu, akar membusuk, dan pada akhirnya menyebabkan kematian (Smith *et al.* 1988; Ploetz 2000; Saravanan *et al.* 2004b; Ploetz 2006).

Kerusakan perkebunan pisang akibat infeksi *Foc* telah terjadi di wilayah Asia, Australia, Afrika, dan daerah tropis di Amerika sejak tahun 1950-an (Hwang & Ko 2004). Infeksi *Foc* di Indonesia terjadi pada 277 titik yang tersebar di 16 provinsi penghasil pisang, dengan kerusakan paling parah terjadi di tiga provinsi di Sumatra sebesar 3300 hektar (Nasir & Jumjunidang 2003; Molina *et al.* 2010). Di Provinsi Lampung, infeksi *Foc* pertama kali terdeteksi hanya pada satu tanaman di perkebunan PT. Nusantara Tropical Fruit (NTF) pada tahun 1993, kemudian terus menyebar dan mencapai luasan 1700-2200 ha pada tahun 2002 (Nasir & Jumjunidang 2002).

Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk mengendalikan infeksi *Foc* pada tanaman pisang, antara lain dengan pemberantasan secara kimia, biologi (biokontrol), fisika, rotasi tanaman ataupun dengan mengontrol nutrisi tanah (Nasir *et al.* 2003). Upaya pengendalian infeksi *Foc* pada tanaman pisang yang paling sering digunakan adalah penggunaan fungisida dan penggunaan bibit

tanaman pisang yang resisten terhadap *Foc* (Nasir *et al.* 2003; Leong *et al.* 2009). Penggunaan fungisida yang berlebihan dan berulang-ulang dapat menyebabkan resistensi pada jamur patogen, sehingga sering dilakukan penambahan dosis yang mengakibatkan terjadinya penurunan kualitas tanah dan diversitas mikroorganisme tanah (Ishii 2004; Laili & Antonius 2009). Penggunaan bibit pisang yang resisten terhadap *Foc* untuk pengendalian *Foc* juga mengalami beberapa kendala, antara lain fertilitas tanaman induk dan viabilitas bibit yang rendah, serta perubahan sifat genetis tanaman terhadap *Foc* yang dapat menyebabkan *Foc* menjadi resisten di tanaman pisang (Ploetz 2006; Leong *et al.* 2009). Penggunaan biokontrol merupakan salah satu alternatif untuk mengendalikan infeksi *Foc* pada tanaman pisang (Ploetz 2006).

Bakteri rizosfer seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Arthrobacter* dan *Streptomyces* merupakan bakteri agen biokontrol yang baik terhadap kapang patogen pada tanaman (Basha & Ulaganathan 2002; de Vasconcellos & Cardoso 2009). Penghambatan pertumbuhan *Foc* oleh bakteri biokontrol dilakukan melalui mekanisme kompetisi nutrisi, oksigen, dan habitat, sintesis enzim hidrolase seperti kitinase, protease dan β -1-3 glukanase serta sekresi senyawa antibiotik atau senyawa antifungal lainnya (Benyagoub *et al.* 1998; Gomes *et al.* 2000; Getha & Vikineswary 2002; de Azaredo *et al.* 2004; Nourozian *et al.* 2006; Rodas-Junco *et al.* 2009). *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. diketahui mampu mensekresikan enzim hidrolase, seperti protease dan kitinase yang berpotensi dalam melisis dinding sel jamur kapang patogen dan menghambat pertumbuhan *Foc* (Gomes *et al.* 2000; de Azaredo *et al.* 2004; Rodas-Junco *et al.* 2009). *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. juga diketahui memiliki kemampuan untuk menghasilkan hormon tumbuh seperti hormon Indole Acetic Acid (IAA), yang berpengaruh pada pertumbuhan tanaman dan berperan penting dalam sistem ketahanan tanaman terhadap patogen (Antonius *et al.* 2009; Kumari *et al.* 2009).

Penggunaan bakteri *Bacillus* 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW sebagai agen biokontrol dalam penelitian ini berdasarkan hasil penapisan mikroorganisme yang berpotensi dalam menghambat pertumbuhan patogen *Foc*. Dari penapisan tersebut, menunjukkan hasil bahwa bakteri *Bacillus* 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki potensi yang lebih baik dalam menghambat patogen *Foc*

dibandingkan dengan isolat bakteri lainnya. Isolat bakteri *Bacillus* 140-B diperoleh dari isolasi sampel tanah area rizosfer tanaman nanas di perkebunan nanas PT. Great Giant Pineapple Company (GGPC), sedangkan *Streptomyces* L.3.1-DW diperoleh dari isolasi sampel tanah area rizosfer tanaman pisang Cavendish di perkebunan pisang PT. Nusantara Tropical Fruit (NTF), Provinsi Lampung. Penggunaan *Bacillus* 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW juga memiliki keuntungan, karena kedua bakteri diisolasi dari area rizosfer tanaman dan dalam penelitian ini juga diaplikasikan di area rizosfer tanaman pisang Cavendish, sehingga diharapkan dapat memberikan pengaruh yang lebih baik dibandingkan isolat bakteri lainnya.

Penelitian tentang biokontrol pada tanaman pisang yang terinfeksi *Foc* telah banyak dilakukan, tetapi masih parsial. Dalam penelitian ini, akan dilakukan kajian menyeluruh tentang potensi bakteri *Bacillus* 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW dalam menghambat *Foc* secara *in-vitro* dan *in-vivo*. Potensi bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dalam menghambat pertumbuhan *Foc* secara *in-vitro* akan dikaitkan dengan kemampuannya untuk menghasilkan enzim protease dan kitinase serta produksi hormon tumbuh IAA. Pada penggunaan biokontrol secara *in-vivo*, dilakukan kajian secara terpadu dengan mengamati pengaruh pemberian agen biokontrol pada tanaman pisang terhadap tingkat infeksi *Foc*, populasi *Foc* di area rizosfer, pengukuran aktivitas enzim resistensi PAL dan TAL, dan pengamatan pertumbuhan tanaman pisang.

Penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan penelitian DIPA Kompetitif LIPI dari Pusat Penelitian Biologi LIPI dengan topik pengembangan teknologi pengendalian penyakit layu *Fusarium* pada tanaman pisang secara biologi berbasis mikroba endofit dan rizosfer. Hasil dari pengujian *Bacillus* 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya secara *in vivo* diharapkan dapat menjadi terobosan baru dalam mengoptimalkan peran biokontrol untuk mengendalikan penyakit layu *Fusarium* yang telah menyebabkan kerusakan di perkebunan pisang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi dan mengkaji potensi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol untuk menghambat pertumbuhan *Foc* secara *in-vitro* dan *in-vivo* pada tanaman pisang Cavendish.

MAKALAH I

KARAKTERISASI AKTIVITAS ANTAGONISME DARI *Bacillus* sp. 140-B DAN *Streptomyces* sp. L.3.1-DW DAN POTENSINYA SEBAGAI AGEN BIOKONTROL TERHADAP KAPANG PATOGEN *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* SECARA *IN-VITRO*

Characterization of in-vitro antagonism activity from Bacillus sp. 140-B and Streptomyces sp. L.3.1-DW and their potential as biocontrol agents toward Fusarium oxysporum Schlecht f. sp. cubense

Nur Laili

lie_azzahra@yahoo.co.id

ABSTRACT

Bacillus sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW were isolated from soil and rhizosphere area of pineapple and banana plantation in Lampung Province. The bacteria were tested against *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (*Foc*) on Potato Dextrose Agar (PDA) medium. The aims of this study were to characterize and investigate the potentials of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW to inhibit *Foc* pathogen. *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW acted as antifungal agents toward *Foc*. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW has larger inhibition zone with inhibition percentage up to 51,43%. The result of this research showed that *Streptomyces* sp. L.3.1-DW was able to produce extracellular protease and chitinase, while *Bacillus* sp. 140-B could only produce extracellular protease. Qualitative test of protease production showed that *Bacillus* sp. 140-B mostly had a larger clearing zone compared to *Streptomyces* sp. L.3.1-DW. Quantitatively, protease and chitinase activities were measured based on growth curve of each bacteria. The higher protease activity of *Bacillus* sp. is 7,90 U/mg protein. at 8 hours after incubation. While *Streptomyces* sp. L.3.1-DW had the highest protease activity is 10,47 U/mg protein. at 36 hours after incubation and chitinase activity is 2,96 U/mg protein. after 84 hours incubation. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW and *Bacillus* sp. 140-B could also produce growth hormone, such as Indole-Acetic Acid (IAA), in which *Streptomyces* sp. L.3.1-DW had higher concentration of IAA compared to *Bacillus* sp. 140-B, with the highest IAA is 7,159 ppm at 72 hours. This result indicated that *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW were potential to use for biocontrol agents to inhibit growth of *Foc* pathogen.

Keywords: Biocontrol, *Foc*, IAA, protease and chitinase enzymes.

PENDAHULUAN

Fusarium oxysporum Schlecht f. sp. *cubense* (*Foc*) adalah jamur kosmopolit di tanah yang berkoloni pada sistem pembuluh tanaman inangnya (Leong *et al.* 2009). *Foc* merupakan agen penyebab penyakit layu *Fusarium* pada tanaman pisang atau lebih dikenal dengan *Panama disease* (Ploetz 2000; Saravanan *et al.* 2004a; Saravanan *et al.* 2004b; Ploetz 2006; Saravanan & Muthusamy 2006). Penyakit layu *Fusarium* pada tanaman pisang ditandai dengan beberapa gejala, antara lain: daun menguning dan layu, batang layu, akar membusuk, dan pada akhirnya menyebabkan kematian (Smith *et al.* 1988; Ploetz 2000; Saravanan *et al.* 2004b; Ploetz 2006).

Biokontrol merupakan salah satu alternatif yang digunakan untuk mengendalikan infeksi *Foc*. Biokontrol didefinisikan sebagai organisme alami, hasil rekayasa genetik, dan gen atau produk gen, yang digunakan untuk mengurangi efek penyakit pada organisme inang yang menguntungkan manusia, serta tidak berbahaya bagi lingkungan (Monte & Llobell 2003). Salah satu mikroorganisme yang banyak digunakan sebagai agen biokontrol adalah bakteri, karena memiliki beberapa keuntungan, antara lain mudah beradaptasi pada lingkungan di mana mereka diaplikasikan dan tidak menimbulkan pencemaran lingkungan (Rodas-Junco *et al.* 2009). Basha dan Ulaganathan (2002) serta de Vasconcellos dan Cardoso (2009) melaporkan bahwa bakteri rizosfer seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Arthrobacter* dan *Streptomyces* merupakan bakteri agen biokontrol yang baik terhadap kapang patogen pada tanaman.

Pengujian penghambatan patogen *Foc* secara *in-vitro* oleh bakteri biokontrol telah banyak dilakukan. Bakteri biokontrol berperan dalam menghambat pertumbuhan *Foc* dalam media agar melalui mekanisme kompetisi nutrisi, oksigen, dan habitat, menghasilkan enzim hidrolase seperti kitinase, protease dan β -1-3 glucanase yang berperan dalam melisiskan dinding sel jamur patogen serta mensekresikan senyawa antibiotik atau senyawa antifungal lainnya (Benyagoub *et al.* 1998; Gomes *et al.* 2000; Getha & Vikineswary 2002; de Azaredo *et al.* 2004; Nourozian *et al.* 2006; Rodas-Junco *et al.* 2009). Sekresi enzim oleh bakteri merupakan mekanisme yang efektif dalam menghambat pertumbuhan patogen. *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. diketahui mampu

mengsekresikan enzim hidrolase, seperti protease dan kitinase yang berpotensi dalam melisiskan dinding sel jamur kapang patogen, sehingga menghambat pertumbuhan *Foc* (Gomes *et al.* 2000; de Azaredo *et al.* 2004; Rodas-Junco *et al.* 2009). Enzim kitinase berperan dalam melisiskan kitin yang merupakan komponen utama dinding sel jamur sehingga terjadi degradasi dinding sel jamur patogen (Gupta *et al.* 1995; Huang *et al.* 2005; Huang & Chen 2008). Aktivitas protease memecah protein menjadi monomer-monomer yang lebih kecil juga berperan dalam proses mikolitik dan degradasi miselia jamur patogen (Basha & Ulaganathan 2002). *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. juga diketahui memiliki kemampuan untuk menghasilkan hormon tumbuh seperti hormon Indole Acetic Acid (IAA), yang berpengaruh pada pertumbuhan tanaman dan berperan penting dalam sistem ketahanan tanaman terhadap patogen (Antonius *et al.* 2009; Kumari *et al.* 2009).

Penelitian ini bertujuan mengkaji potensi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol untuk menghambat pertumbuhan *Foc*. Isolat bakteri *Bacillus* sp.140-B diisolasi dari perkebunan nanas PT. Great Giant Pineapple Company (GGPC), sedangkan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diisolasi dari perkebunan pisang Cavendish PT. Nusantara Tropical Fruit (NTF), Provinsi Lampung. Penggunaan isolat bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berdasarkan hasil penapisan uji antagonisme mikroorganisme terhadap patogen *Foc*, di mana kedua bakteri tersebut menunjukkan aktivitas antagonisme lebih baik dibandingkan isolat bakteri lainnya, sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai agen biokontrol. Selain itu, dalam penelitian ini akan dilakukan karakterisasi terhadap potensi bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol yang meliputi kemampuannya untuk menghasilkan enzim protease dan kitinase serta hormon tumbuh IAA. Sintesis enzim protease dan kitinase, serta produksi hormon tumbuh IAA merupakan bagian dari mekanisme bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW untuk menghambat pertumbuhan patogen *Foc*.

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri *Bacillus* sp.140-B dan *Streptomyces* sp. L.3-1.DW yang merupakan koleksi laboratorium Ekofisiologi dan telah diidentifikasi dengan sekuen 16S rDNA; media Nutrient Agar (NA); media Yeast Starch Agar (YSA); media International *Streptomyces* Project-2 Agar (ISP-2) pH 7,2; media Potato Dextrose Agar (PDA); media Nutrient Broth (NB); media Potato Dextrose Broth (PDB); media ISP-2 Broth; media Yeast Extract Manitol Broth (YEMB); media Protease-Skim Milk Agar 1% pH 7,0; media Kitin Agar 0,5% pH 6,8; media Exoproteinase pH 7,2; kertas saring Whatman[®] No. 41 diameter 125 mm; alkohol 70%; spiritus; akuades; buffer fosfat pH 7,0; buffer Tris HCl pH 8,0; reagen Salkowski; reagen Bradford; reagen-reagen untuk pengukuran aktivitas enzim protease dan kitinase; azocasein; kitin koloid; *microtube*; seperangkat *micropipette*; pompa vakum Gast[®]; seperangkat corong Buchner; peralatan gelas; sentrifus; spektrofotometer; *rotary shaker*; *water bath*; komputer; kamera digital.

B. Cara Kerja

1. Pengukuran pertumbuhan bakteri

Isolat bakteri *Bacillus* sp.140-B ditumbuhkan ke dalam media NB yang terdiri dari 5 g pepton dan 3 g beef extract dalam 1000 ml akuades. Kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel kultur bakteri untuk pengukuran pertumbuhannya setiap 2 jam sampai bakteri mencapai fase stasioner, dan dilakukan pengukuran pertumbuhan dengan menentukan nilai absorbansi atau tingkat kekeruhan (OD) kultur bakteri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm dengan 2 ulangan.

Pengukuran pertumbuhan pada *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dilakukan dengan metode filtrasi dan penentuan bobot kering dan bobot basah (Sejiny 1991; Tawfik & Ramadan 1991). Isolat bakteri ditumbuhkan pada media ISP-2 pH 7,2 yang terdiri dari yeast extract 4 g; malt extract 10 g; dextrose 4 g; agar 20 g dalam 1000 ml akuades. Kultur diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 100

rpm. Kemudian diambil sampel sebanyak 10 ml setiap 12 jam dengan 2 ulangan sampai bakteri mencapai fase stasioner. Sampel bakteri disaring menggunakan kertas saring Whatman[®] No. 41 diameter 125 mm yang telah diletakkan pada corong Buchner yang dihubungkan pompa vakum. Proses penyaringan dilakukan selama 10 menit, kemudian kertas saring diambil dan dikeringkan dalam oven pada suhu 70 °C selama 24 jam. Setelah dikeringkan, kertas saring ditimbang dan dilakukan penghitungan bobot kering sel bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW. Bobot kering dan bobot basah ditentukan dengan menghitung selisih antara berat akhir kertas saring yang mengandung sel bakteri dengan berat awal kertas saring.

2. Uji aktivitas antagonisme *Bacillus* sp.140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW terhadap *Foc* secara *in vitro*

Pengujian aktivitas biokontrol *Bacillus* sp.140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW terhadap jamur patogen *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *cubense* menggunakan metode *cross plug* yang dimodifikasi oleh Getha & Vikineswary (2002) dengan 2 ulangan. Satu ose kultur bakteri ditumbuhkan di tengah cawan petri yang berisi media PDA dan dinkubasi pada suhu 28 °C selama 2 hari. Kemudian 1 blok agar *F. oxysporum* Schlect f. sp. *cubense* (*Foc*) berdiameter 5 mm ditumbuhkan pada media PDA di kedua sisi cawan petri dengan jarak 2 cm dari bakteri (Getha & Vikineswary 2002). Untuk perlakuan kontrol, 1 blok agar *Foc* ditumbuhkan pada media PDA di kedua sisi cawan petri yang tidak diinokulasi dengan bakteri. Setelah 5 hari inkubasi, kemudian diamati zona penghambatan yang dibentuk oleh bakteri di sekitar *Foc*.

3. Pengukuran aktivitas enzim protease dan kitinase

3.1. Uji kualitatif aktivitas protease

Uji aktivitas protease secara kualitatif ditentukan dengan menggunakan metode *disc blank* (Basha & Ulaganathan 2002). Isolat bakteri *Bacillus* sp.140-B diinokulasi pada media NB dan diinkubasi pada *rotary shaker* selama 24 jam. Sedangkan bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diinokulasi pada media ISP-2 dan diinkubasi pada *rotary shaker* selama 72 jam. Selanjutnya *disc blank* dicelupkan pada kultur bakteri yang telah diinkubasi dan diletakkan pada media Protease-

Skim Milk Agar 1% pH 7,0 dengan 2 ulangan dan diinkubasi pada suhu 28 °C. Media Protease-Skim Milk Agar 0,8% terdiri dari glukosa 1,0 g; yeast extract 2,5 g; casein 1,0 g; susu skim 10 g; dan Agar 22 g dalam 1000 ml akuades. Kemudian dilakukan pengamatan zona bening yang terbentuk di sekeliling *disc blank* dan diukur diameternya.

3.2. Uji kualitatif aktivitas kitinase

Uji aktivitas kitinase secara kualitatif ditentukan dengan menggunakan metode *disc blank* (Getha & Vikineswary 2002). Isolat bakteri *Bacillus* sp.140-B diinokulasi pada media NB dan diinkubasi pada *rotary shaker* selama 24 jam. Sedangkan bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diinokulasi pada media ISP-2 dan diinkubasi pada *rotary shaker* selama 72 jam. Selanjutnya *disc blank* dicelupkan pada kultur bakteri yang telah diinkubasi dan diletakkan pada media Kitin Agar 0,5% pH 6,8 dengan 2 ulangan dan diinkubasi pada suhu 28 °C. Media Kitin Agar 0,5% terdiri dari kitin koloid 5,0 g; glukosa 3,0 g; polypeptone 1,0 g; KH₂PO₄ 1,0 g; MgSO₄.7H₂O 0,5 g; dan Agar 22 g dalam 1000 ml akuades. Kemudian dilakukan pengamatan zona bening yang terbentuk di sekeliling *disc blank* dan diukur diameternya.

3.3. Analisis kuantitatif aktivitas protease

Analisis kuantitatif aktivitas protease dilakukan menggunakan substrat azocasein 0,5% berdasarkan metode dari Benitez *et al.* (2001) dengan 2 ulangan. Isolat bakteri diinokulasikan pada media Exoproteinase pH 7,2, yang terdiri dari pepton 10,0 g; yeast extract 5,0 g; dan 100 ml BS *stock solution* dalam 1000 ml aquades. BS *stock solution* terdiri dari 70 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 1mM MnCl₂; 2 mM FeSO₄; 7,5 mM Na₂SO₄; dan 50 mM KH₂PO₄. Kemudian diambil 1 ml kultur bakteri pada fase log pertumbuhannya, dan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Selanjutnya dibuat campuran larutan reaksi yang terdiri dari 100 µl substrat azocasein 0,5% dalam 100 mM buffer Tris.HCl 1 M pH 8,0 dan 100 µl sampel enzim. Kemudian larutan diinkubasi pada suhu 40 °C selama 1 jam. Setelah 1 jam inkubasi, reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 400 µl asam trichloroacetic (TCA) 10% dan disentrifus

dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 700 µl NaOH 525 mM. Selanjutnya dilakukan pengukuran OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 442 nm. Satu unit azocasein didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan pada setiap peningkatan OD sebesar 0,01 unit per jam (Benitez *et al.* 2001). Aktivitas spesifik enzim protease diukur sebagai perbandingan antara aktivitas enzim protease (unit/ml) dengan kadar protein dalam enzim (mg/ml). Kadar protein dalam enzim ditentukan dengan Metode Bradford (1976) dan dihitung dengan persamaan pada kurva standar BSA.

3.4. Analisis kuantitatif aktivitas kitinase

Analisis kuantitatif aktivitas kitinase dilakukan menggunakan substrat kitin koloid 0,5% berdasarkan metode dari Shanmugaiah *et al.* (2008) yang dimodifikasi dengan 2 ulangan. Dibuat campuran larutan reaksi yang terdiri dari 0,5 ml substrat kitin koloid 0,5% dalam 50 mM buffer Tris.HCl pH 8,0 dan diinkubasi 37 °C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml sampel enzim dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah 30 menit inkubasi, tabung yang berisi larutan reaksi dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya larutan disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Setelah sentrifugasi, diambil supernatannya sebanyak 250 µl dan ditambahkan 50 µl Potassium Tetraborat 0,1 M, kemudian dimasukkan dalam air mendidih selama 3 menit dan didinginkan dalam air mengalir. Selanjutnya ditambahkan 1,25 ml 4-(Dimetilamino) Benzaldehida, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Setelah 20 menit inkubasi, selanjutnya dilakukan pengukuran OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 584 nm. Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan oleh 1 µmol substrat N-acetylglucosamine sebagai standar (Mathivanan *et al.* 1998). Aktivitas spesifik enzim kitinase diukur sebagai perbandingan antara aktivitas enzim kitinase (unit/ml) dengan kadar protein dalam enzim (mg/ml). Kadar protein dalam enzim ditentukan dengan Metode Bradford (1976) dan dihitung dengan persamaan pada kurva standar BSA.

3.5. Penentuan kadar protein

Kadar protein dalam sampel enzim ditentukan menggunakan metode Bradford (1976). Dalam metode tersebut digunakan Reagen Bradford terdiri dari 10 mg Comassie Brilliant Blue yang dilarutkan dengan 5 ml etanol 95% dan 10 ml H₃PO₄ 85%. Larutan diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 100 ml dan dihomogenkan. Kemudian larutan disaring dengan kertas saring dan disimpan dalam botol gelap pada suhu rendah. Penentuan kadar protein dilakukan dengan mengambil sampel enzim sebanyak 100 µl dan ditambahkan 5 ml Reagen Bradford, kemudian divortex. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 30 °C. Setelah 15 menit inkubasi, dilakukan pengukuran OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

Kadar protein dihitung berdasarkan persamaan dari kurva standar protein. Pembuatan kurva standar protein menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA). Ditimbang 1 mg BSA dan dilarutkan dalam 1 ml buffer fosfat pH 7,0. Kemudian dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 µg/ml. Selanjutnya ditambahkan 5 ml Reagen Bradford dan divortex. Kemudian larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 30 °C. Setelah 15 menit inkubasi, dilakukan pengukuran OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

4. Uji hormon tumbuh Indole Acetic Acid (IAA)

4.1. Produksi hormon tumbuh IAA

Bakteri ditumbuhkan dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi media Yeast Extract Manitol Broth (YEMB) yang mengandung 0,1% L-tryptophan dan 1% glukosa dengan 2 ulangan dan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm dalam rentang waktu 24, 48 dan 72 jam. Selanjutnya kultur bakteri disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Setelah sentrifugasi, supernatan dipisahkan dari peletnya dan digunakan untuk analisis kadar IAA (Sinha & Basu 1981; Patten & Glick 1996).

4.2. Analisis kadar hormon tumbuh IAA

Supernatan sebanyak 1 ml dicampur dengan 4 ml reagen Salkowski dan diinkubasi di tempat gelap pada suhu ruang selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar IAA menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm. Adanya indole yang dihasilkan ditunjukkan dengan perubahan warna pada supernatan menjadi merah muda. Kadar IAA ditentukan dengan membandingkan hasil pengukuran pada kurva standar IAA (Patten & Glick 1996).

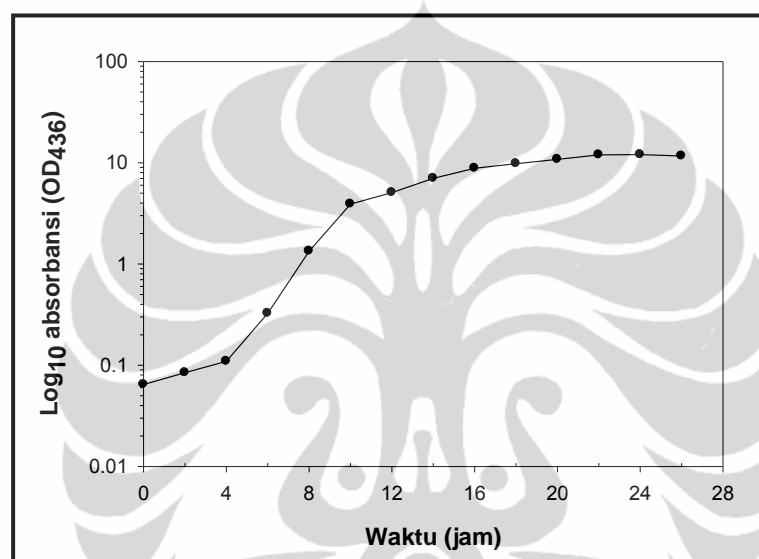
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengukuran pertumbuhan bakteri

Pengukuran pertumbuhan bakteri merupakan hal yang penting untuk dilakukan dalam karakterisasi bakteri. Dari pengukuran pertumbuhannya, maka dapat diketahui fase-fase dalam kurva pertumbuhan bakteri, yang terdiri dari fase lag, eksponensial/logaritmik, stasioner dan kematian. Hal tersebut berkaitan erat dengan laju pertumbuhan bakteri, di mana laju pertumbuhan maksimum bakteri terjadi fase eksponensial. Fase eksponensial dari pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan penambahan nilai absorbansi bakteri yang lebih besar dibandingkan dengan penambahan absorbansi pada saat fase lag dan stasioner. Pada fase eksponensial, biomassa bakteri akan meningkat dan terjadi aktivitas metabolisme, sintesis enzim, hormon, antibiotik dan senyawa metabolit sekunder lainnya. Oleh karena itu, pengukuran aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri dilakukan pada saat pertumbuhan bakteri mencapai fase eksponensial. Aktivitas enzim tertinggi yang dihasilkan oleh bakteri diperkirakan dicapai pada saat fase eksponensial, sedangkan produksi metabolit sekunder diduga dicapai pada saat fase eksponensial akhir atau awal stasioner.

Pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. 140-B dalam media NB ditunjukkan dengan adanya peningkatan nilai absorbansi pada setiap 2 jam pengukuran. Nilai absorbansi tertinggi *Bacillus* sp. 140-B dicapai pada umur 24 jam, dan pada jam ke-26 terjadi penurunan absorbansi. Dari hasil pengukuran absorbansi kultur bakteri, kemudian dibuat kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. 140-B (Gambar I.1). Berdasarkan gambar dari kurva pertumbuhan bakteri, diketahui bahwa

Bacillus sp. 140-B dapat tumbuh dengan cepat dan memasuki fase eksponensial pada saat pertumbuhan jam ke-4 sampai ke-10, kemudian mulai masuk ke fase stasioner setelah kultur bakteri berumur 12 jam. do Nascimento dan Martins (2004) telah melaporkan dalam penelitian sebelumnya, bahwa pertumbuhan *Bacillus* sp. SMI-2 mencapai fase eksponensial pada jam ke-5 sampai ke-9, kemudian pertumbuhannya mulai menurun dan memasuki fase stasioner pada jam ke-10.

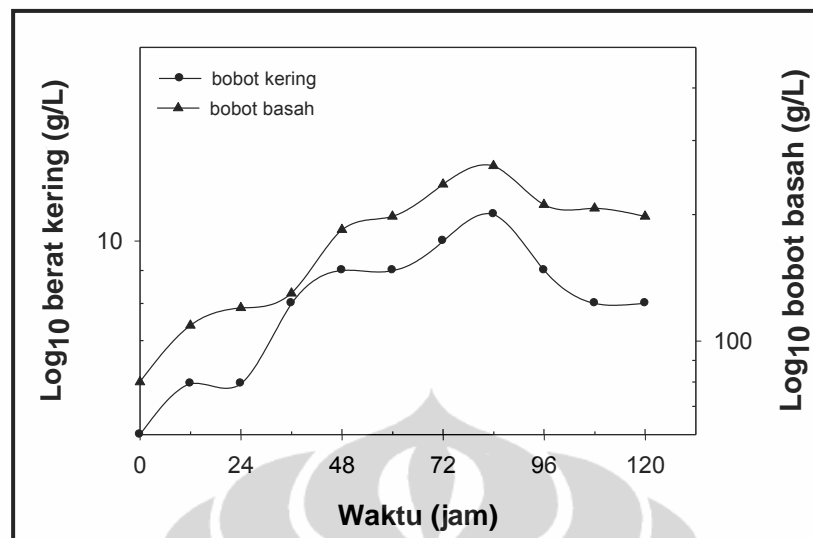


Gambar I.1. Kurva pertumbuhan *Bacillus* sp. 140-B pada media NB

Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri pada Gambar I.1, dapat ditentukan waktu generasi dan konstanta laju pertumbuhan *Bacillus* sp. 140-B. Waktu generasi (*doubling time*) adalah waktu yang dibutuhkan oleh sel bakteri untuk membelah menjadi dua, sedangkan konstanta laju pertumbuhan menunjukkan banyaknya bakteri yang tumbuh per unit waktu pada fase eksponensial. Waktu generasi dari *Bacillus* sp. 140-B adalah 69,58 menit/generasi dan konstanta laju pertumbuhannya adalah 0,595/jam. Sementara itu, hasil penelitian dari Mayanti dan Ariesyady (2009) menunjukkan bahwa waktu generasi bakteri golongan *Bacillus* berkisar antara 25 sampai 43 menit dengan konstanta laju pertumbuhan 0,9 – 1,52/jam. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa laju pertumbuhan *Bacillus* sp. 140-B lebih lambat dibandingkan dengan

hasil penelitian sebelumnya. Hal tersebut dapat disebabkan oleh pengaruh komposisi media pada pertumbuhannya. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Mayanti dan Ariesyady (2009), media NB yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan *Bacillus* sp. terdapat penambahan garam NaCl dan sumber nitrogen lainnya, yaitu yeast extract. Penambahan NaCl dan yeast extract tersebut dapat memacu bakteri untuk mempercepat laju pertumbuhannya.

Pengukuran pertumbuhan bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dalam media ISP-2 dilakukan dengan mengukur bobot kering kultur bakteri dengan rentang waktu setiap 12 jam. Selain menghitung bobot kering, dilakukan juga penghitungan bobot basah sel bakteri yang telah disaring. Metode pengukuran bobot kering dan bobot basah dilakukan karena *Streptomyces* sp. L.3.1-DW merupakan bakteri yang menghasilkan hifa, sehingga tidak memungkinkan untuk mengukur turbiditasnya. Oleh karena itu, untuk menentukan pertumbuhannya, dilakukan dengan mengukur biomasnya. Hasil pengukuran menunjukkan adanya peningkatan bobot kering dan bobot basah sel bakteri dari waktu ke waktu. Nilai bobot kering dan bobot basah tertinggi dari bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dicapai pada umur kultur 84 jam, dan mulai menurun pada jam ke-96. Dari hasil pengukuran bobot kering dan bobot basah, diketahui bahwa kurva pertumbuhan bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki bentuk yang sama (Gambar I.2). Pertumbuhan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memasuki fase eksponensial pada umur 36-84 jam, dan mulai masuk ke fase stasioner setelah kultur bakteri berumur 96 jam. Hasil pengukuran pertumbuhan *Streptomyces* sp. MR10 dan MR13 yang dilakukan oleh Sejiny (1991) dalam penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bakteri tersebut tumbuh maksimum dan mencapai fase eksponensial pada hari ke-4 sampai ke-7 setelah inkubasi. Sedangkan pertumbuhan *Streptomyces* sp. MY16 mencapai pertumbuhan maksimum pada hari ke-4 yang merupakan fase eksponensial akhir. Dengan demikian, hasil pengukuran pertumbuhan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan yang sama dengan *Streptomyces* sp. MY16 yang diteliti oleh Sejiny (1991).



Gambar I.2. Kurva pertumbuhan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW pada media ISP-2

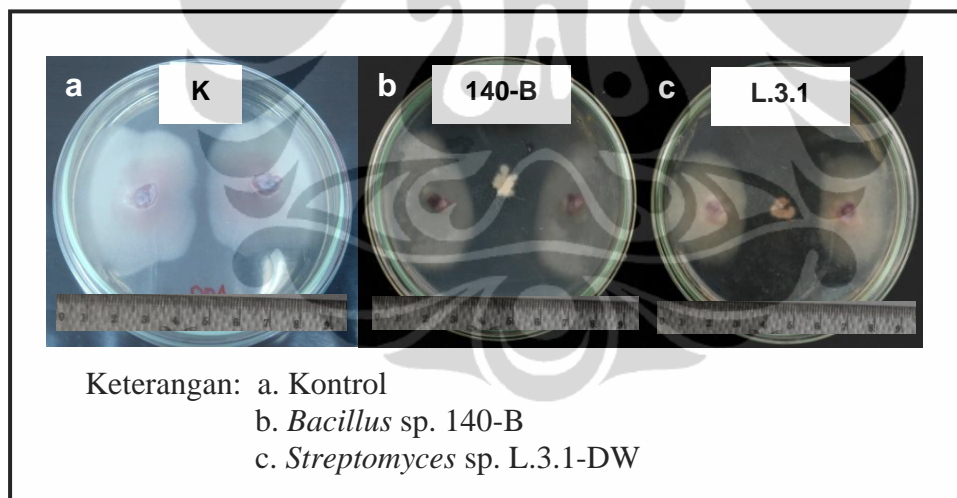
Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri pada Gambar I.2, dapat ditentukan waktu generasi dan konstanta laju pertumbuhan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW. Waktu generasi dari *Streptomyces* sp. L.3.1-DW adalah 47,63 jam (1,98 hari)/generasi dengan konstanta laju pertumbuhan sebesar 0,021/jam (0,5/hari). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui fase pertumbuhan serta waktu generasi dan laju pertumbuhan dari bakteri *Streptomyces* sp. Pengukuran pertumbuhan bakteri *Streptomyces* sp. yang dilakukan oleh Sejiny (1991), menunjukkan bahwa waktu generasi *Streptomyces* sp. berkisar antara 1,44 sampai 2,74 hari dengan konstanta laju pertumbuhan 0,36 – 0,69/hari. Tawfik & Ramadan juga melaporkan bahwa *Streptomyces* sp. memiliki waktu generasi antara 1,395 sampai 2,548 hari/generasi, dengan konstanta laju pertumbuhan 0,39 – 0,72/hari. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan kesamaan dengan hasil pengukuran pertumbuhan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dalam penelitian ini. Hal tersebut disebabkan adanya pengaruh komponen media yang sama, yaitu malt extract sebagai sumber karbon yang juga digunakan pada pengukuran pertumbuhan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dan *Streptomyces* sp. pada penelitian sebelumnya.

Waktu generasi bakteri sangat dipengaruhi oleh kondisi optimum dalam pertumbuhannya, seperti komposisi media, pH, dan temperatur. Berdasarkan

waktu generasinya, bakteri dapat digolongkan menjadi dua, yaitu bakteri dengan laju pertumbuhan yang cepat dan lambat. Bakteri yang memiliki waktu generasi kurang dari 4 jam digolongkan sebagai bakteri dengan laju pertumbuhan cepat (Sadowsky *et al.* 1983). Dengan demikian, *Bacillus* sp. 140-B termasuk ke dalam bakteri dengan laju pertumbuhan cepat, sedangkan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW termasuk dalam kelompok bakteri dengan laju pertumbuhan yang lambat.

2. Uji aktivitas biokontrol dari *Bacillus* sp.140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW terhadap *Foc* secara *in vitro*

Hasil pengujian aktivitas antagonisme *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW terhadap *Foc* secara *in-vitro* pada media PDA menunjukkan hasil positif (Gambar I.3). Bakteri agen biokontrol tersebut memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan kapang patogen *Foc* yang diindikasikan dengan terbentuknya zona penghambatan di sekitar *Foc*.



Gambar I.3. Hasil uji antagonisme bakteri agen biokontrol terhadap *Foc* dengan metode *cross plug* dengan inkubasi selama 5 hari (Dokumentasi Laboratorium Ekofisiologi P2 Biologi-LIPI)

Pengujian aktivitas antagonisme bakteri agen biokontrol terhadap *Foc* menunjukkan persentase penghambatan yang berbeda antar perlakuan (Tabel I.1). Penghitungan persentase penghambatan menggunakan persamaan yang telah dilaporkan oleh Nourozian *et al.* (2007), yaitu:

$$\% \text{ penghambatan} = ((C - T)/C) \times 100$$

Keterangan: C= diameter *Foc* kontrol

T= diameter *Foc* dengan perlakuan biokontrol

Tabel I.1. Persentase penghambatan *Foc* oleh agen biokontrol

Perlakuan	Indeks % penghambatan
Kontrol	0,00
<i>Bacillus</i> sp. 140-B	42,85
<i>Streptomyces</i> L.3.1-DW	51,43

Berdasarkan Tabel I.1, diketahui bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki persentase penghambatan terhadap *Foc* lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B. Hasil penelitian Nourozian *et al.* (2007) juga menunjukkan bahwa persentase penghambatan patogen oleh bakteri *Streptomyces* sp. (87,5%) lebih tinggi dibandingkan *Bacillus subtilis* (51,5%). Aktivitas antagonisme *Streptomyces* sp. L.3.1-DW yang lebih baik tersebut dimungkinkan karena bakteri ini menghasilkan senyawa antibiotik dan antifungal lebih banyak dan lebih baik dalam menghambat patogen *Foc* secara *in-vitro* dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B.

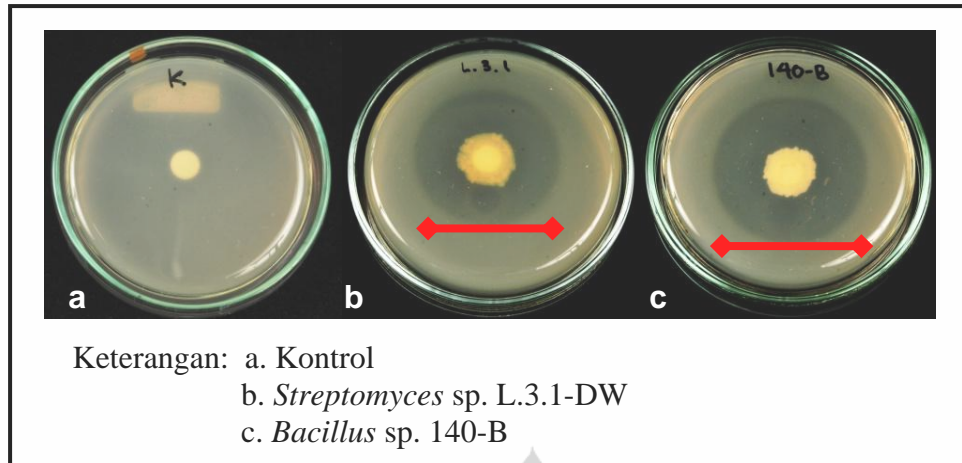
Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, telah banyak dilaporkan bahwa aktivitas antagonisme dari bakteri biokontrol terhadap patogen dilakukan melalui beberapa mekanisme antara lain: 1). kompetisi nutrisi, oksigen, dan habitat; 2). parasitisme, dengan menghasilkan enzim hidrolase seperti kitinase, protease dan β -1-3 glucanase yang berperan dalam melisiskan dinding sel jamur patogen; 3). sekresi senyawa antibiotik atau senyawa antifungal dan metabolit sekunder lainnya yang dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen (Benyagoub *et al.* 1998; Gomes *et al.* 2000; Getha & Vikineswary 2002; Woo *et al.* 2002; de Azaredo *et al.* 2004; Compant *et al.* 2005; Monteiro *et al.* 2005;

Nourozian *et al.* 2006; Prapagdee *et al.* 2008; Rodas-Junco *et al.* 2009). Meskipun dalam penelitian ini belum dilakukan uji lanjut, terdapat kemungkinan bahwa zona penghambatan yang dibentuk oleh bakteri biokontrol pada uji *in-vitro* di cawan petri menunjukkan adanya kompetisi nutrisi dan habitat di cawan petri, di mana bakteri mengabsorpsi nutrisi dari media agar dan menghambat pertumbuhan patogen. Bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diduga dapat mensintesis enzim protease dan kitinase yang berperan dalam proses penghambatan pertumbuhan patogen *Foc*. Kemungkinan lainnya adalah bakteri tersebut menghambat pertumbuhan *Foc* dengan mengeluarkan senyawa metabolit sekunder pada media agar. Senyawa metabolit sekunder seperti antibiotik dilaporkan memiliki peranan penting dalam menghambat pertumbuhan patogen karena dapat merusak hifa kapang patogen, sehingga hifa mengecil, abnormal, atau mengembung (Getha & Vikineswary 2002).

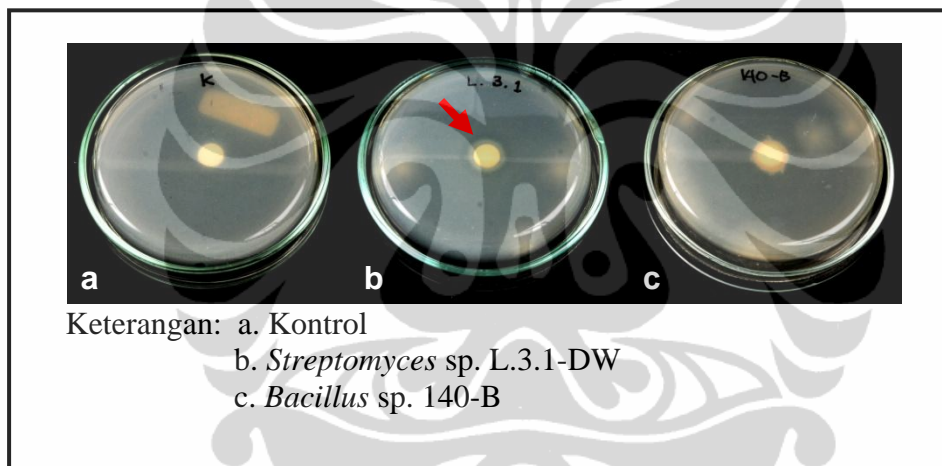
3. Pengukuran aktivitas enzim protease dan kitinase

3.1. Uji kualitatif enzim protease dan kitinase

Uji aktivitas enzim protease dan kitinase dari bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dengan metode *disc blank* pada media Protease-Skim Milk Agar 1% pH 7,0 dan media Kitin Agar 0,5% pH 6,8 menunjukkan hasil positif. Hal tersebut ditandai dengan terbentuknya zona bening di media agar yang mengandung substrat susu skim 1% dan kitin koloid 0,5% (Gambar I.4 dan I.5). Zona bening yang terbentuk mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mensekresikan enzim yang mampu merombak substrat protein dan kitin yang terdapat dalam media agar. Berdasarkan hasil pengujian, bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki aktivitas enzim protease dan kitinase, sedangkan *Bacillus* sp. 140-B hanya memiliki aktivitas enzim protease.



Gambar I.4. Hasil uji kualitatif aktivitas enzim protease pada media Protease-Skim Milk Agar 1% (Dokumentasi Laboratorium Ekofisiologi P2 Biologi-LIPI)



Gambar I.5. Hasil uji kualitatif aktivitas enzim kitinase pada media Kitin Koloid Agar 0,5% (Dokumentasi Laboratorium Ekofisiologi P2 Biologi-LIPI)

Hasil pengujian aktivitas enzim protease dan kitinase secara kualitatif menunjukkan tingkat aktivitas yang berbeda antara *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dengan *Bacillus* sp. 140-B (Tabel I.2). Hal tersebut ditunjukkan dengan diameter zona bening yang terbentuk pada media Protease-Skim Milk Agar 1% dan media Kitin Koloid Agar 0,5%.

Tabel I.2. Uji aktivitas enzim protease dan kitinase secara kualitatif

Perlakuan	Waktu inkubasi (Jam)	Diameter zona bening (cm)	
		Protease	Kitinase
Kontrol	24	td	td
	48	td	td
	72	td	td
<i>Bacillus</i> sp. 140-B	24	1,0	td
	48	1,7	td
	72	1,85	td
<i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW	24	0,9	td
	48	1,3	td
	72	1,7	0,5

Keterangan: td = tidak terdeteksi

Berdasarkan Tabel I.2, diketahui bahwa *Bacillus* sp. 140-B memiliki aktivitas protease yang lebih tinggi dibandingkan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW. Namun, *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mensintesis dua jenis enzim hidrolase, yaitu enzim protease dan kitinase, sedangkan *Bacillus* 140-B hanya mensintesis satu jenis enzim, yaitu protease. Dalam pengamatan aktivitas enzim yang disintesis oleh *Streptomyces* sp. L.3.1-DW, diketahui bahwa sintesis enzim kitinase membutuhkan waktu lebih lama dibandingkan enzim protease. Aktivitas enzim protease mulai terdeteksi pada jam ke-24 setelah inkubasi, tetapi aktivitas kitinase baru terdeteksi setelah pengamatan pada jam ke-72. Hasil pengukuran diameter zona bening juga menunjukkan bahwa diameter zona bening pada pengujian enzim protease lebih besar dibandingkan kitinase (Gambar I.4 dan I.5). Hal tersebut dapat mengindikasikan bahwa aktivitas enzim kitinase lebih kecil dibandingkan enzim protease, karena semakin besar diameter zona bening yang terbentuk, maka aktivitas enzimnya juga semakin besar.

3.2. Uji kuantitatif enzim protease dan kitinase

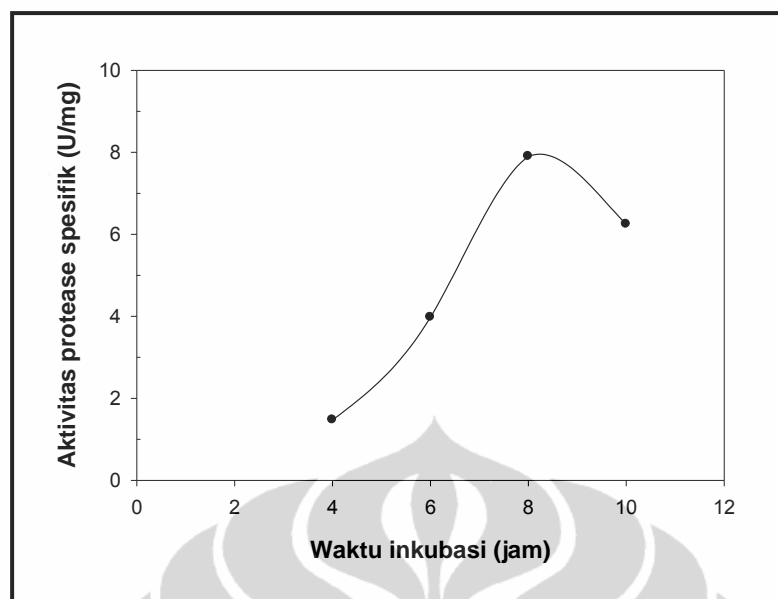
Uji kuantitatif aktivitas enzim protease dilakukan pada fase eksponensial dari pertumbuhan bakteri. Pengujian aktivitas enzim pada bakteri *Bacillus* sp. 140-B dilakukan pada saat umur kultur 4 - 10 jam. Aktivitas enzim protease dari *Bacillus* sp. 140-B ditunjukkan pada tabel I.3.

Tabel I.3. Aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. 140-B

Jam ke-	Aktivitas protease (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas protease spesifik (U/mg protein)
4	9,76	6,63	1,47
6	26,16	6,58	3,98
8	39,26	4,97	7,90
10	45,16	7,23	6,25

Aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. 140-B mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan umur kultur pada fase eksponensial (Gambar I.6). Namun, pada aktivitas enzim spesifik tertinggi terjadi pada jam ke-8 sebesar 7,90 U/mg protein, kemudian menurun pada jam ke-10. Hasil pengukuran aktivitas protease pada bakteri *Bacillus* sp. SMI-2 yang dilakukan oleh do Nascimento dan Martins (2004) menunjukkan bahwa aktivitas protease tertinggi dicapai pada jam ke-9 setelah inkubasi, sebesar 1,93 U/mg protein, kemudian menurun pada jam ke-10. Hasil penelitian ini menunjukkan kesamaan waktu sintesis enzim protease dengan penelitian sebelumnya, tetapi *Bacillus* sp. 140-B memiliki aktivitas protease lebih tinggi dibandingkan dengan *Bacillus* sp. pada penelitian sebelumnya.

Aktivitas protease dari *Bacillus* sp. 140-B dapat dikorelasikan dengan kurva pertumbuhannya, di mana fase eksponensial terjadi pada jam ke-4 sampai ke-10. Pada jam ke-10 merupakan fase eksponensial akhir dan memasuki fase stasioner, sehingga aktivitas sintesis enzim dan senyawa metabolit lainnya akan menurun. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. diduga berkaitan langsung dengan proses metabolisme aktif selama pertumbuhan kultur bakteri pada fase eksponensial (do Nascimento & Martins 2004).



Gambar I.6. Aktivitas enzim protease dari bakteri *Bacillus* sp. 140-B

Pengukuran aktivitas enzim protease dan kitinase pada *Streptomyces* sp.

L.3.1-DW dilakukan pada saat kultur mencapai fase eksponensial, yaitu pada jam ke-36 sampai 84. Aktivitas enzim protease dan kitinase dari *Streptomyces* sp.

L.3.1-DW ditunjukkan pada tabel I.4 dan I.5.

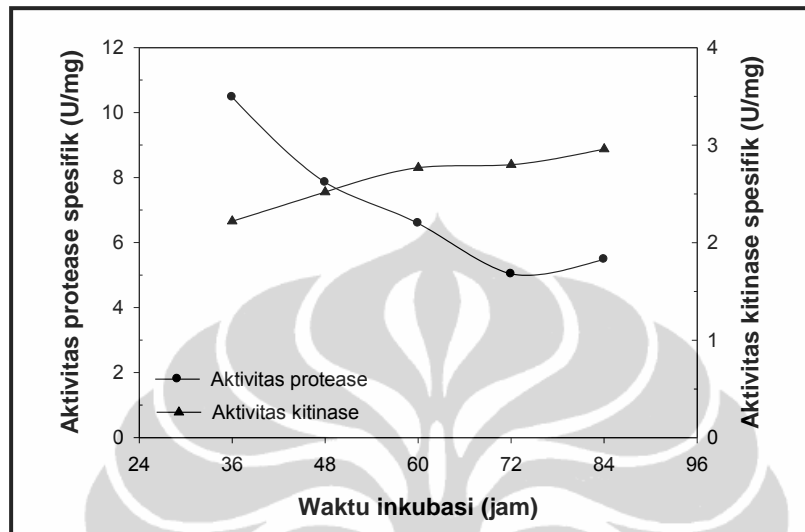
Tabel I.4. Aktivitas enzim protease *Streptomyces* sp. L.3.1-DW

Jam ke-	Aktivitas protease (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas protease spesifik (U/mg protein)
36	39,88	3,81	10,47
48	56,23	7,16	7,85
60	62,18	9,44	6,59
72	64,48	12,83	5,03
84	65,98	12,04	5,48

Tabel I.5. Aktivitas enzim kitinase *Streptomyces* sp. L.3.1-DW

Jam ke-	Aktivitas kitinase (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas kitinase spesifik (U/mg protein)
36	8,34	3,75	2,22
48	8,93	3,54	2,52
60	9,29	3,36	2,77
72	10,46	3,73	2,80
84	9,95	3,36	2,96

Hasil uji kuantitatif menunjukkan aktivitas enzim protease spesifik mengalami penurunan, sedangkan aktivitas kitinase spesifik mengalami peningkatan pada saat fase eksponensial (Gambar I.7).



Gambar I.7. Aktivitas enzim protease dan kitinase dari bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW

Berdasarkan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. L.3.1-DW pada Gambar I.7, diketahui bahwa aktivitas protease berbanding terbalik dengan aktivitas kitinase. Aktivitas protease mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi, sedangkan aktivitas kitinase mengalami peningkatan. Berdasarkan hasil tersebut, diperkirakan bahwa aktivitas metabolisme protein terjadi lebih cepat pada saat fase eksponensial awal, sehingga sintesis enzim protease tertinggi dicapai pada jam ke-36, sebesar 10,47 U/mg protein, kemudian menurun pada jam ke-48 dan seterusnya. Sedangkan aktivitas metabolisme karbohidrat terjadi lebih lambat dibandingkan dengan metabolisme protein, sehingga sintesis enzim kitinase juga lebih lambat dibandingkan protease. Aktivitas kitinase tertinggi terjadi pada saat fase eksponensial di jam ke-84 sebesar 2,96 U/mg protein. Hasil penelitian sebelumnya, yang dilakukan oleh Rifaat *et al.* (2005) menunjukkan bahwa bakteri *Streptomyces microflavus* memiliki aktivitas protease tertinggi sebesar 2,42 U/mg protein. Sedangkan hasil pengukuran aktivitas kitinase dari bakteri *Streptomyces* sp. pernah dilaporkan oleh Gomes *et al.* 2000 dengan menggunakan substrat kitin koloid, menunjukkan

bahwa aktivitas kitinase berkisar antara 0,25 – 1,65 U/mg protein. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas protease dan kitinase dari bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW lebih tinggi dibandingkan dengan *Streptomyces* sp. pada penelitian sebelumnya.

Pengukuran aktivitas enzim secara kuantitatif dapat dikorelasikan dengan hasil pengujian secara kualitatif. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa aktivitas kitinase baru terdeteksi setelah 72 jam inkubasi, sedangkan aktivitas protease telah terdeteksi pada jam ke-24. Diameter zona bening yang terbentuk juga mengindikasikan bahwa aktivitas kitinase lebih rendah dibandingkan protease. Hasil uji kuantitatif juga menunjukkan bahwa aktivitas kitinase *Streptomyces* sp. L.3.1-DW relatif lebih rendah dibandingkan aktivitas proteasenyanya. Hal ini dapat juga disebabkan pengukuran aktivitas kitinase hanya dilakukan pada eksokitinase dan tidak mengukur endokitinasenya. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diduga memiliki aktivitas endokitinase yang lebih besar daripada eksokitinasenya.

Aktivitas enzim hidrolase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW menunjukkan korelasi dengan fase-fase pertumbuhannya. Aktivitas tertinggi dari enzim yang dihasilkan dicapai pada saat fase eksponensial. Pada fase eksponensial, kondisi pertumbuhan bakteri berbanding lurus dengan ketersediaan nutrisi dalam media tumbuhnya, di mana laju pertumbuhannya maksimum sehingga aktivitas metabolisme dan sintesis enzimnya juga berada pada kondisi maksimum. Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mengalami penurunan pada saat fase eksponensial akhir atau saat memasuki fase stasioner. Pada fase-fase tersebut sudah tidak ada nutrisi untuk pertumbuhan bakteri, maupun substrat yang dapat dirombak oleh bakteri, sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzimnya.

Aktivitas antagonisme bakteri biokontrol terhadap kapang patogen dipengaruhi oleh kemampuannya dalam sintesis enzim hidrolase yang berperan dalam menghambat pertumbuhan kapang patogen. Enzim-enzim hidrolase seperti kitinase dan protease memiliki peran penting dalam melawan kapang patogen dengan mendegradasi dinding selnya (Gomes *et al.* 2000; Prapagdee *et al.* 2008; Quecine *et al.* 2008; Shanmugaiah *et al.* 2008). Protease dan kitinase ekstraseluler

yang dihasilkan oleh bakteri memiliki peran penting dalam aktivitas degradasi dinding sel dan menghambat pertumbuhan jamur patogen, semakin besar enzim kitinase dan protease yang disekresikan oleh bakteri maka aktivitas penghambatan pertumbuhan jamur patogen juga semakin besar (Basha & Ulaganathan 2002; Laili & Antonius 2009).

Hasil pengukuran aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki korelasi dengan aktivitas antagonismenya terhadap kapang patogen *Foc*. Sebagaimana diketahui bahwa aktivitas antagonisme *Streptomyces* sp. L.3.1-DW lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B karena *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mampu mensintesis enzim protease dan kitinase, sedangkan *Bacillus* sp. 140-B hanya mensintesis protease. Keberadaan protease dapat melisis sel kapang patogen dan merusak miselinya melalui proses proteolitik, sedangkan kitinase berperan aktif dalam melisis kitin yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel jamur melalui proses kitinolitik (Gupta *et al.* 1995; Gomes *et al.* 2000; Basha & Ulaganathan 2002; Huang *et al.* 2005; Huang & Chen 2008; Nandakumar *et al.* 2007).

4. Uji hormon tumbuh Indole Acetic Acid (IAA)

Hasil analisis IAA pada bakteri biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW menunjukkan bahwa kedua bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk menghasilkan hormon tumbuh IAA. Analisis dilakukan pada waktu inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Analisis IAA dalam penelitian ini menggunakan asam amino tryptophan yang merupakan prekursor utama yang berperan penting dalam biosintesis IAA. Kadar hormon tumbuh IAA yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW ditunjukkan pada tabel I.6.

Tabel I.6. Kadar hormon tumbuh IAA pada bakteri agen biokontrol

Bakteri biokontrol	Waktu inkubasi (Jam)	Kadar IAA (ppm)
<i>Bacillus</i> sp. 140-B	24	1,038
	48	0,864
	72	2,136
<i>Streptomyces</i> sp. L.3.1-DW	24	0,152
	48	4,894
	72	7,159

Berdasarkan Tabel I.6, diketahui bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mampu menghasilkan IAA dengan kadar yang lebih tinggi daripada *Bacillus* sp. 140-B. Kedua bakteri tersebut menghasilkan kadar IAA tertinggi pada masa inkubasi kultur 72 jam. Hormon tumbuh IAA merupakan salah satu produk metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri setelah proses metabolisme untuk produksi metabolit primer selesai. Wahyudi *et al.* (2011) juga menyebutkan bahwa kadar hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri melimpah pada saat fase stasioner. Produksi IAA akan meningkat pada saat kondisi pertumbuhan menurun, ketersediaan karbon yang terbatas dan terjadi dalam kondisi lingkungan dengan pH asam (Ona *et al.* 2003; Ona *et al.* 2005; van de Broek *et al.* 2005). Kondisi tersebut menunjukkan keterkaitan antara produksi IAA dengan pertumbuhan bakteri yang memasuki fase stasioner.

Sintesis hormon tumbuh IAA pada bakteri juga dapat dikaitkan dengan keberadaan spora yang dihasilkan oleh bakteri. Pada jam ke-72, bakteri *Bacillus* sp. 140-B telah mencapai fase stasioner, di mana ketersediaan nutrisi dalam media pertumbuhannya terbatas, sehingga memicu bakteri untuk menghasilkan endospora. Endospora merupakan spora yang dihasilkan oleh bakteri pada saat kondisi lingkungan tidak mendukung untuk pertumbuhannya sehingga bakteri akan berdormansi dan tidak mati. Endospora tersebut bersifat tahan terhadap keadaan yang ekstrim, seperti pH, suhu, ketersediaan air, dan nutrisi. Bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW juga termasuk kelompok bakteri yang menghasilkan spora, di mana spora yang dihasilkan tersebut dapat memicu bakteri untuk menghasilkan hormon tumbuh IAA.

Analisis hormon IAA dilakukan untuk mengetahui potensi kedua bakteri terkait dengan perannya sebagai agen biokontrol. Ketika diaplikasikan pada tanaman, diharapkan agen biokontrol tersebut dapat menghambat pertumbuhan

patogen, juga dapat mendukung pertumbuhan tanaman. Hormon IAA merupakan salah satu bagian mekanisme bakteri biokontrol sebagai agen *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR). Hormon tumbuh IAA yang dihasilkan oleh PGPR berfungsi sebagai sinyal molekuler yang penting dalam regulasi perkembangan tanaman, memacu perkembangan perakaran tanaman inang, meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen dan memacu pertumbuhan tanaman (Cattelan *et al.* 1999; Shaharoon *et al.* 2006; Egamberdiyeva 2007; Ashrafuzzaman *et al.* 2009; Joshi & Bath 2011). Produksi hormon tumbuh IAA oleh bakteri biokontrol juga berperan dalam memacu peningkatan *induced systemic resistance* (ISR) untuk meningkatkan sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Shiddique 2006).

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berpotensi untuk menghambat pertumbuhan kapang patogen *Foc*, di mana *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki indeks persentase penghambatan lebih besar dibanding *Bacillus* sp. 140-B, yaitu 51,43%. Aktivitas antagonisme bakteri agen biokontrol terjadi melalui sintesis enzim protease dan kitinase serta produksi hormon tumbuh IAA. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mampu mensintesis enzim protease dan kitinase, sedangkan *Bacillus* sp. 140-B hanya mensintesis enzim protease. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW juga memiliki kadar hormon tumbuh IAA yang lebih tinggi dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B, yaitu 7,159 ppm pada jam ke-72. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kemampuan penghambatan yang lebih baik terhadap kapang patogen *Foc* dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B.

SARAN

1. Pada pengukuran enzim kitinase, perlu dilakukan pengukuran aktivitas endokitinase, sehingga dapat diperoleh aktivitas kitinase yang lebih akurat dari bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW.

2. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang senyawa antifungal yang dihasilkan oleh bakteri biokontrol yang berperan dalam menghambat pertumbuhan kapang patogen *Foc*.

DAFTAR ACUAN

- Antonius, S., N. Laili, Yanti, A. Nurkanto & D. Agustiyani. 2009. Eksplorasi dan penapisan mikroba dari Malinau sebagai agen hayati pendukung pertanian yang berkelanjutan. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki Malang 24-25 Juli 2009*. 347--357.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, M.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah & S. Meon. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, **8**(7): 1247--1252.
- Basha, S. & K. Ulaganathan. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science*, **82**(12): 1457--1463.
- Benitez, J.A., A.J. Silva & R.A. Finkelstein. 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. *American Society for Microbiology*, **69**(10): 6549--6553.
- Benyagoub, M., N. Benhamou & O. Carisse. 1998. Cytochemical investigation of the antagonistic interaction between a *Microsphaeropsis* sp. (isolate P130A) and *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **88**: 605--613.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement & E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospect. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(9): 4951--4959.
- de Azeredo, L.A.I., D.M.G. Freire, R.M.A. Soares, S.G.F. Leite & R.R.R. Coelho. 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbiology Technology*, **34**: 354--358.

- de Vasconcellos, R.L.F. & E.J.B.N. Cardoso. 2009. Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol*, **54**: 807--816.
- do Nascimento, W.C.A. & M.L.L. Martins. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**: 91--96.
- Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, **36**: 184--189.
- Getha, K. & S. Vikineswary. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**: 303--310.
- Gomes, R.C., L.T.A.S. Semedo, R.M.A. Soares, C.S. Alviano, L.F. Linhares & R.R.R. Coelho. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letter Applied Microbiology*, **30**: 146--150.
- Gupta, R., R.K. Saxena, P. Chaturvedi & J.S. Virdi. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: Its potential in fungal cell wall lysis. *Journal Applied Bacteriology*, **78**: 378--383.
- Huang, C.J. & C.Y. Chen. 2008. Synergistic interactions between chitinase ChicCW and fungicides against plant fungal pathogen. *Journal Microbiology Biotechnology*, **18**(4): 784--787.
- Huang, C.J., T.K. Wang, S.C. Chung & C.Y. Chen. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-29. *Journal Biochemistry Molecular Biology*, **38**(1): 82--88.
- Joshi, P. & A.B. Bath. 2011. Diversity and function of plant growth-promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalaya Region. *International Journal of Environmental Sciences*, **1**(6): 1135--1143.

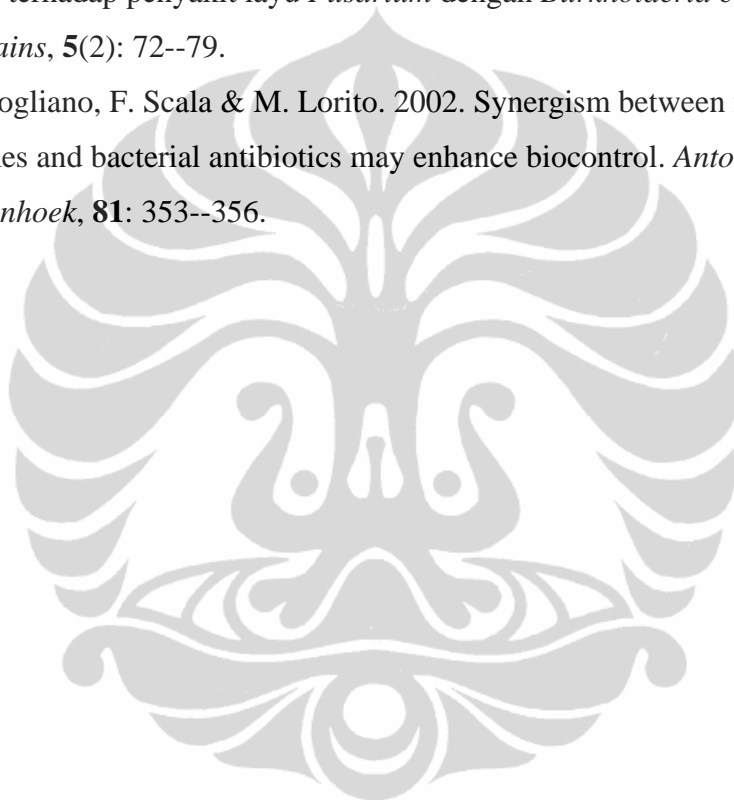
- Kim, H.S., J. Park, S.W. Choi, K.H. Choi, G.P. Lee, S.J. Ban, C.H. Lee & C.S. Kim. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology*, **41**(3): 196--201.
- Kumari, B.S., M.R. Ram & K.V. Mallaiah. 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. *Journal of Microbiology Research*, **3**(1): 10--14.
- Laili, N. & S. Antonius. 2009. Potensi aktinomisetes indigenous Malinau sebagai agen biokontrol untuk mendukung pertanian yang berwawasan lingkungan di Malinau Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional Biologi 7 ITS Surabaya 07 Nopember 2009*. 219--227.
- Leong, S.K., Z. Latiffah & S. Baharuddin. 2009. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. *American Journal of Applied Sciences*, **6**(7): 1301--1307.
- Mayanti, B. & H.D. Ariesyady. 2009. Identifikasi keberagaman bakteri pada *commercial-seed* pengolah limbah cair cat. Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Institut Teknologi Bandung. 1--11.
- Monte, E. & A. Llobell. 2003. *Trichoderma* in organic agriculture. *Proceedings V World Avocado Congress 2003*, 725--733.
- Monteiro, L., R.dL.R. Mariano & A.M. Santo-Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**(1): 23--29.
- Nandakumar, R., S. Babu, T. Raguchander & R. Samiyappan. 2007. Chitinolytic activity of native *Pseudomonas fluorescens* strains. *Journal of Agriculture Sciences*, **9**: 61--68.
- Nasir, N., P.A. Pittaway & K.G. Pegg. 2003. Effect of organic amendments and solarisation on *Fusarium* wilt in susceptible banana plantlets, transplanted into naturally infested soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, **54**: 251--257.
- Nourozian, J., H.R. Etebarian & G. Khodakaramian. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin Journal Science Technology*, **28**(1): 29--38.

- Ona, O., I. Smets, P. Gysegom, K. Bernaerts, J. van Impe, E. Prinsen & J. Vanderleyden. 2003. The effect of pH on indole-3-acetic-acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp7. *Symbiosis*, **35**:199--208.
- Ona, O., J. van Impe, E. Prinsen & J. Vanderleyden. 2005. Growth and indole-3-acetic-acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letter*, **246**: 125--132.
- Patten, C. & B.R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**: 207--220.
- Ploetz, R.C. 2000. Panama disease: A classic and destructive disease of banana. Online: *Plant Health Progress*, 10.1094/PHP-2000-1204-01-HM.
- Ploetz, R.C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *The American Phytopathological Society*, **96**(6): 653--656.
- Prapagdee, B., C. Kuekulvong & S. Mongkolsuk. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, **4**(5): 330--337.
- Quecine, M.C., W.L. Araujo, J. Marcon, C.S. Gai, J.L. Azevedo & A.A. Pizzirani-Kleiner. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, **47**: 486--491.
- Rifaat, H.M., S.M. Hassanein, O.H. El-Said, S.A. Saleh & M.S.M. Selim. 2005. Purification and characterisation of extracellular neutral protease from *Streptomyces microflavus*. *Arabian Journal of Biotechnology*, **9**(1): 51--60.
- Rodas-Junco, B.A., H.F. Magana-Sevilla, J.M. Tun-Suarez & A. Reyes-Ramirez. 2009. Antifungal activity in vitro of native *Bacillus* sp. strains against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Research Journal of Biological Sciences*, **4**(9): 985--989.
- Sadowsky, M.J., H.H. Keyser & B.B. Bohlool. 1983. Biochemical characterization of fast and slow growing rhizobia that nodulate soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**(4): 716--722.

- Saravanan, T., M. Muthusamy & T. Marimuthu. 2004a. Effect of *Pseudomonas flourescens* on *Fusarium* wilt pathogen in banana rhizosphere. *Journal of Biological Sciences*, **4**(2): 192--198.
- Saravanan, T., R. Bhaskaran & M. Muthusamy. 2004b. *Pseudomonas flourescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) againts *Fusarium* wilt disease. *Plant Pathology Journal*, **3**(2): 72--80.
- Saravanan, T. & M. Muthusamy. 2006. Influence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder and Hansen on 2,4-diacetylphloroglucinol production by *Pseudomonas flourescens* migula in banana rhizosphere. *Journal of Plant Protection Research*, **46**(3): 241--254.
- Sejiny, M.J. 1991. Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. *Journal King Abdul Azis University: Science*, **3**: 21--29.
- Shanmugaiah, V., N. Mathivanan, N. Balasubramanian & P.T. Manoharan. 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*, **7**(15): 2562--2568.
- Siddiqui, Z.A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui, Z.A (ed.). 2006. *Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Amsterdam, 111-142.
- Sinha, A. & P.S. Basu. 1981. Indole-3-acetic acid and its metabolism in root nodule of *Pongamia pinnata* (L) Pierre. *Biochemical Physiology Pflanzen*, **176**(3): 218--227.
- Smith, I.M., S.A. Archer, J. Dunez, R.A. Lelliot & D.H. Phillips. 1988. *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 583 hlm.
- Tawfik, K.A. & E.M. Ramadan. 1991. Factors affecting the biological activity of *Streptomyces aureofaciens* MY18 and *S. roseviolaceus* MR13. *Journal King Abdul Azis University: Science*, **3**: 5--19.
- van de Broek, A., P. Gysegom, O. Ona, N. Hendrickx, E. Prinsen, J. van Impe & J. Vanderleyden. 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a

cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **18**: 311--323.

- Wahyudi, A.T., R.P. Astuti, A. Widyawati, A. Meryandini & A.A. Nawangsih. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strain isolated from rizhosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, **3**(2): 34--40.
- Widono, S., C. Sumardiyanto & B. Hadisutrisno. 2003. Pengimbasan ketahanan pisang terhadap penyakit layu *Fusarium* dengan *Burkholderia cepacia*. *Agrosains*, **5**(2): 72--79.
- Woo, S., V. Fogliano, F. Scala & M. Lorito. 2002. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 353--356.



MAKALAH II

APLIKASI *Bacillus* sp. 140-B DAN *Streptomyces* sp. L.3.1-DW UNTUK MENGENDALIKAN INFEKSI *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* PADA TANAMAN PISANG (*Musa acuminata*) var. CAVENDISH

Application of Bacillus sp. 140-B and Streptomyces sp. L.3.1-DW to control Fusarium oxysporum Schlecht f. sp. cubense infection on banana plant (Musa acuminata) var. Cavendish

Nur Laili

lie_azzahra@yahoo.co.id

ABSTRACT

Fusarium oxysporum Schlecht f. sp. *cubense* (*Foc*) is the causal pathogen of wilt disease of banana. Abilities of biocontrol agents *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW to control *Foc* infection in banana were studied. Application of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as single isolate or their combination in banana were tested under greenhouse conditions for 30 days. The aims of this study were to evaluate the potential of *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW as biocontrol agents in banana and investigate their abilities to produce plant resistancy enzymes. Plants treatments with biocontrol agents to control *Foc* in banana gave a significant effect compared to control. The lowest disease severity was found on the treatment with single isolate *Streptomyces* sp.L.3.1-DW with infection percentage 29,33%. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW could suppress *Foc* population ($6,25 \times 10^5$ CFU/ml) in rhizosfer area after 30 days innoculation. Application of biocontrol agents could also increase plant resistancy by producing phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia lyase (TAL) enzymes as the earliest responses of banana againts *Foc* infection. In this work, the control plant which have more *Foc* infection had higher PAL and TAL activity compared to treatments. *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW also act as *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR), that indicated by improvement of banana growth, in which *Streptomyces* L.3.1-DW caused the highest growth of banana either with or without *Foc* infection. This study indicated that *Bacillus* sp. 140-B and *Streptomyces* sp. L.3.1-DW could be used as alternative solutions to control *Fusarium* wilt in banana var. Cavendish.

Keywords: Banana, Biocontrol, *Foc*, *Fusarium* wilt, PAL and TAL activity, PGPR.

PENDAHULUAN

Pisang merupakan salah satu komoditas buah tropis yang banyak diminati oleh konsumen dengan produksi sampai lebih dari seratus juta ton setiap tahun (Ploetz 2006). Perkebunan pisang merupakan salah satu usaha perkebunan terpenting di dunia, sebagai sumber pendapatan dan komoditas ekspor utama di beberapa negara di wilayah Amerika Latin, Afrika dan Asia (Dita *et al.* 2010). Perkebunan pisang di Indonesia tersebar dari Aceh sampai Papua, di mana sekitar 66,56% terdapat di Jawa dan Provinsi Lampung (Jumjunidang *et al.* 2012). Buah pisang yang dihasilkan dari kedua wilayah tersebut mencapai 31% dari total produksi buah-buahan perkebunan (Jumjunidang *et al.* 2012). Salah satu kultivar pisang untuk industri perkebunan yang banyak dibudidayakan adalah pisang Cavendish, karena memiliki beberapa sifat unggul, antara lain rasa, aroma, warna, tekstur serat dan kandungan nutrisinya (Kumar *et al.* 2010).

Seiring dengan perkembangan perkebunan pisang, penyakit yang menyerang tanaman pisang juga berkembang dan menjadi permasalahan global yang mengancam kelangsungan produksi pisang. Salah satu penyakit tersebut adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh kapang patogen *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense*, atau lebih dikenal dengan *Panama disease* (Ploetz 2000; Perez-Vicente 2004; Saravanan *et al.* 2004a; Saravanan *et al.* 2004b; Ploetz 2006; Saravanan & Muthusamy 2006; Dita *et al.* 2010; Jumjunidang *et al.* 2012). Jenis *Foc* yang menginfeksi pisang Cavendish adalah *Foc* ras 4 yang memiliki tingkat virulensi lebih tinggi dibandingkan *Foc* ras 1, 2, dan 3 karena mampu menginfeksi kultivar tanaman pisang Cavendish yang resisten terhadap infeksi *Foc* (Ploetz 2006). Tanaman yang terinfeksi *Foc* akan menunjukkan gejala daun menguning dan layu pada daun yang paling bawah dan diikuti oleh daun di atasnya sampai akhirnya tanaman akan mati (Salerno *et al.* 2000; Leong *et al.* 2009; Dita *et al.* 2010). Gejala internal menunjukkan adanya diskolorisasi pada rizoma dan pembuluh xylem di pseudostem mengalami nekrosis (Ploetz 2000; Ploetz 2006; Dita *et al.* 2010).

Kerusakan perkebunan pisang akibat infeksi *Foc* telah terjadi di wilayah Asia, Australia, Afrika, dan daerah tropis di Amerika sejak tahun 1950-an (Hwang & Ko 2004). Kerusakan perkebunan pisang di Leyte, Filipina berkisar 5-65%,

sedangkan di Malaysia dan Indonesia, luas perkebunan yang rusak mencapai 5000 hektar (Bastasa & Baliad 2005; Molina *et al.* 2010). Infeksi *Foc* di Indonesia terjadi pada 277 titik yang tersebar di 16 provinsi penghasil pisang, dengan kerusakan paling parah terjadi di tiga provinsi di Sumatra sebesar 3300 hektar (Nasir & Jumjunidang 2003; Molina *et al.* 2010). Di Provinsi Lampung, infeksi *Foc* pertama kali terdeteksi hanya pada satu tanaman di perkebunan PT. Nusantara Tropical Fruit (NTF) pada tahun 1993. Infeksi *Foc* kemudian terus menyebar ke area yang lebih besar, dan mencapai 1700-2200 ha pada tahun 2002, (Nasir & Jumjunidang 2002).

Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk mengendalikan infeksi *Foc* pada tanaman pisang, antara lain dengan pemberantasan secara kimia, biologi (biokontrol), fisika, rotasi tanaman ataupun dengan mengontrol nutrisi tanah (Nasir *et al.* 2003). Upaya pengendalian infeksi *Foc* pada tanaman pisang yang paling sering digunakan adalah penggunaan fungisida dan penggunaan bibit tanaman pisang yang resisten terhadap *Foc* (Nasir *et al.* 2003; Leong *et al.* 2009). Penggunaan fungisida yang berlebihan dan berulang-ulang dapat menyebabkan resistensi pada jamur patogen sehingga sering dilakukan penambahan dosis yang mengakibatkan penurunan kualitas tanah dan diversitas mikroorganisme tanah (Ishii 2004; Laili & Antonius 2009). Penggunaan bibit pisang yang resisten terhadap *Foc* untuk pengendalian *Foc* juga mengalami beberapa kendala, antara lain fertilitas tanaman induk dan viabilitas bibit yang rendah, serta perubahan sifat genetis tanaman terhadap *Foc* yang dapat menyebabkan *Foc* menjadi resisten di tanaman pisang (Ploetz 2006; Leong *et al.* 2009). Penggunaan biokontrol merupakan alternatif untuk pengendalian infeksi *Foc* pada tanaman pisang (Ploetz 2006).

Bakteri rizosfer seperti *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. berpotensi sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan infeksi patogen *Foc* dan memiliki beberapa keuntungan. Beberapa keuntungan dari bakteri rizosfer *Bacillus* sp. antara lain bersifat non-patogen sehingga cukup aman untuk diaplikasikan dan dapat meningkatkan produktivitas tanaman (Asaka & Shoda 1996; Basha & Ulaganathan 2002). *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. juga mampu mensekresikan enzim hidrolase, seperti protease dan kitinase yang berpotensi dalam melisiskan

dinding sel jamur patogen *Foc*, sehingga pertumbuhan *Foc* pada tanaman pisang akan terhambat (Gomes *et al.* 2000; de Azaredo *et al.* 2004; Rodas-Junco *et al.* 2009). Penggunaan biokontrol juga memiliki keuntungan lainnya karena dapat memicu tanaman pisang untuk meningkatkan mekanisme pertahanannya terhadap *Foc*, yaitu dengan menghasilkan enzim-enzim ketahanan seperti enzim phenylalanine ammonia-lyase (PAL) dan tyrosine ammonia-lyase (TAL) (Ebel 1986; Khan *et al.* 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan serangan patogen *Foc* pada tanaman pisang Cavendish. Isolat bakteri *Bacillus* sp.140-B diisolasi dari perkebunan nanas PT. Great Giant Pineapple Company (GGPC), sedangkan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diisolasi dari perkebunan pisang Cavendish PT. Nusantara Tropical Fruit (NTF), Provinsi Lampung. Penggunaan isolat bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berdasarkan hasil penapisan uji antagonisme mikroorganisme terhadap patogen *Foc*, di mana kedua bakteri tersebut menunjukkan aktivitas antagonisme lebih baik dibandingkan isolat bakteri lainnya, sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai agen biokontrol. Kajian dilakukan secara terpadu dengan mengamati pengaruh pemberian agen biokontrol pada tanaman pisang terhadap tingkat infeksi *Foc*, populasi *Foc* di area rizosfer, pengukuran aktivitas enzim resistensi, dan pengamatan pertumbuhan tanaman pisang. Aplikasi biokontrol dilakukan dengan menggunakan isolat *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal dan kombinasinya. Kajian terhadap respon ketahanan tanaman pisang yang telah diberi agen biokontrol dilakukan dengan mengkaji kemampuan tanaman dalam menghasilkan enzim PAL dan TAL yang berperan dalam peningkatan ketahanan tanaman pisang terhadap infeksi patogen *Foc*. Penggunaan *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya diharapkan dapat menjadi alternatif baru untuk mengoptimalkan peran biokontrol pada pengendalian *Foc* di lapangan.

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit tanaman pisang Cavendish klon Grand Naim yang berumur 2 bulan dengan tinggi antara 12,88-14,38 cm. Bibit diperoleh dari Laboratorium Kultur Jaringan Seamo Biotrop, Bogor. Isolat bakteri *Bacillus* sp. 140-B, *Streptomyces* sp. L.3.1-DW koleksi Laboratorium Ekofisiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI; media pasir steril; media Hoagland; alkohol 70%; akuades; L-phenylalanine (Sigma Aldrich[®]); L-tyrosine (Merck[®]); Trans-cinamic acid (Sigma Aldrich[®]); P-coumaric acid (Sigma Aldrich[®]); buffer Tris-HCl 500 μ mol pH 8,0; HCl 5N; buffer sodium citrate pH 5,0; buffer fosfat pH 7,0; media Nutrient Broth (NB); Media ISP 2 Broth; Media PDB; media PDA; plastik; kertas saring Whatman[®] No. 41 diameter 125 mm; pompa vakum Gast[®]; seperangkat corong Buchner; mortar dan penumbuk; pot plastik; ember; peralatan berkebung; peralatan gelas; haemocytometer; *microtube*; seperangkat *micropipette*; sentrifus; spektrofotometer; *rotary shaker*; *water bath*; penggaris; komputer; kamera digital.

B. Cara Kerja

1. Uji biokontrol *Bacillus* sp. 140-B DAN *Streptomyces* sp. L.3.1-DW pada tanaman pisang secara *in-vivo* di rumah kaca

Uji aktivitas biokontrol pada tanaman pisang Cavendish dilakukan dengan menggunakan metode *Double Tray* yang dikembangkan oleh Mak *et al.* 2004. Tanaman pisang yang digunakan dalam uji rumah kaca berusia dua bulan dengan ketinggian 12 – 15 cm. Penelitian disusun dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tujuh perlakuan dan empat ulangan.

Perlakuan dalam uji penghambatan *Foc* pada tanaman pisang sebagai berikut.

1. Kontrol negatif, tanaman pisang ditumbuhkan tanpa *Foc* dan isolat bakteri pada media pasir.
2. Kontrol positif, tanaman pisang ditumbuhkan pada media pasir yang diinokulasi dengan *Foc*.

3. Tanaman pisang ditumbuhkan dengan isolat *Bacillus* sp. 140-B tanpa *Foc* pada media pasir.
4. Tanaman pisang ditumbuhkan dengan isolat *Streptomyces* sp. L.3.1-DW tanpa *Foc* pada media pasir.
5. Tanaman pisang dengan *Foc* pada media pasir dan ditumbuhkan dengan isolat *Bacillus* sp. 140-B.
6. Tanaman pisang dengan *Foc* pada media pasir dan ditumbuhkan dengan isolat *Streptomyces* sp. L.3.1-DW.
7. Tanaman pisang dengan *Foc* pada media pasir dan ditumbuhkan dengan kombinasi isolat *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW.

1.1. Persiapan kultur bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW

Bakteri *Bacillus* sp. 140-B ditumbuhkan dalam media NB dan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 16 jam. Bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW ditumbuhkan pada media ISP 2 dan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 72 jam. Selanjutnya kultur bakteri disentrifus pada kecepatan 9500 rpm selama 25 menit. Setelah sentrifus, supernatannya dibuang dan peletnya dilarutkan dengan media Hoagland, kemudian diukur kepadatan sel bakteri hingga mencapai 10^8 CFU/ml.

1.2. Persiapan kapang patogen *Foc*

Kapang patogen *Foc* ditumbuhkan pada media PDB dan diinkubasi pada *rotary shaker* pada suhu 28°C selama lima hari. Kemudian diukur kepadatan sporanya menggunakan *haemocytometer* dan diperoleh kepadatannya sebesar 5×10^6 CFU/ml. Kemudian kultur *Foc* difiltrasi menggunakan kertas saring Whatman[®] No. 41 diameter 125 mm yang diletakkan pada corong Buchner yang sudah terpasang dengan pompa vakum. Setelah proses filtrasi, pelet *Foc* dilarutkan dengan aquades steril.

1.3. Penanaman bibit tanaman pisang

Tanaman pisang yang berumur dua bulan dibersihkan bagian akarnya dari media tanamnya, kemudian direndam dalam ember yang berisi larutan bakteri agen biokontrol selama 1 jam. Setelah proses perendaman, bibit tanaman pisang ditanam ke dalam pot yang berisi media pasir steril. Selanjutnya dilakukan penyiraman dengan media Hoagland yang berisi larutan bakteri biokontrol. Setelah 48 jam, kultur *Foc* yang telah dilarutkan dengan akuades disiramkan ke daerah perakaran tanaman. Pada perlakuan kontrol negatif hanya disiram dengan media Hoagland, sedangkan pada kontrol positif disiram dengan kultur *Foc* dan media Hoagland. Penyiraman media Hoagland pada tanaman dilakukan dengan sedikit mengaduk media pasir dan dilakukan 2 hari sekali selama masa percobaan. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman pisang selama satu bulan sehingga dapat diketahui besarnya pengaruh dan respon tanaman pisang terhadap pemberian agen biokontrol.

2. Pengamatan parameter pada tanaman pisang percobaan di rumah kaca

Aplikasi bakteri biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW akan memberikan dampak pada tanaman pisang yang diinfeksi *Foc* pada tanaman pisang. Oleh karena itu dilakukan pengamatan terhadap beberapa parameter yang berhubungan dengan aplikasi biokontrol pada tanaman pisang di rumah kaca. Parameter-parameter tersebut antara lain tingkat infeksi *Foc*, populasi *Foc* di area rizosfer, aktivitas enzim PAL dan TAL, serta pertumbuhan tanaman pisang.

2.1. Penghitungan tingkat infeksi *Foc* pada tanaman pisang

Untuk mengetahui dampak pemberian biokontrol pada tanaman pisang, maka dilakukan penghitungan tingkat infeksi *Foc*. Penghitungan tingkat infeksi *Foc* pada tanaman pisang dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan oleh Anitha dan Rabeeth (2009), yaitu dengan menghitung persentase daun yang mengalami gejala terinfeksi *Foc* pada setiap tanaman, dengan persamaan sebagai berikut.

$$\% \text{ infeksi} = \frac{\text{Jumlah daun dengan gejala terinfeksi } Foc}{\text{Jumlah total daun}} \times 100$$

Hervas *et al.* (1997) mengelompokkan gejala infeksi *Foc* pada tiap-tiap tanaman pada skala 0 sampai 4 berdasarkan persentase tingkat infeksi *Foc* pada tanaman, yaitu:

1. 0 = 0% tingkat infeksi
2. 1 = 1 – 33% tingkat infeksi
3. 2 = 34 – 66% tingkat infeksi
4. 3 = 67 – 100% tingkat infeksi
5. 4 = tanaman mati

2.2. Penghitungan populasi *Foc* pada area rizosfer tanaman pisang setelah pemberian agen biokontrol

Tingkat infeksi *Foc* pada tanaman pisang akan berdampak pada populasi *Foc* di area rizosfernya, sehingga perlu dilakukan penghitungan populasi *Foc*. Penghitungan populasi *Foc* dilakukan dengan mengambil sampel tanah di area rizosfer tanaman, kemudian diukur dengan metode pengenceran bertingkat dan *Total Plate Count* (TPC) pada media PDA. Penghitungan populasi *Foc* dilakukan pada hari ke-14 dan 30 setelah tanam. Hal tersebut dilakukan untuk membandingkan populasi *Foc* pada perlakuan tanpa bakteri agen biokontrol dan perlakuan dengan pemberian bakteri agen biokontrol.

2.3. Aktivitas enzimatik yang terkait dengan resistensi tanaman terhadap infeksi *Foc* (PAL dan TAL)

2.3.1. Ekstraksi enzim Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) dan Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL)

Ekstraksi enzim PAL dan TAL dari tanaman pisang dilakukan dengan menggunakan metode yang telah dilaporkan oleh Christopher *et al.* 2010. Sebanyak 1 g sampel akar tanaman pisang digerus dan dihomogenkan dengan 2 ml dari 0,1 M sodium citrate buffer (pH 5,0) pada suhu 4 °C. Campuran tersebut

kemudian disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C. Selanjutnya supernatan di ekstraksi dengan 0,1 M sodium phospat buffer (pH 7,0), dan disimpan dalam deep freezer (-70 °C) sampai digunakan untuk analisis enzim PAL dan TAL.

2.3.2. Analisis enzim PAL dan TAL

Analisis enzim PAL dan TAL dilakukan dengan menggunakan metode Beaudoin-Eagan dan Thorpe (1985) yang telah dimodifikasi oleh Khan *et al.* (2003). Campuran larutan reaksi terdiri dari 100 µl sampel enzim, 500 µmol buffer Tris-HCl (pH 8), 6 µmol L-phenylalanine untuk analisis PAL dan 5,5 µmol L-tyrosine untuk analisis TAL. Larutan kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 40 °C. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan 50 µl HCl 5N. Untuk analisis enzim PAL ditentukan dengan pengukuran asam trans-cinamic menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 290 nm. Sedangkan untuk analisis enzim TAL ditentukan dengan pengukuran asam p-coumaric menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 333 nm. Aktivitas PAL dibandingkan dengan kurva standar asam trans-cinamic, sedangkan TAL dibandingkan dengan kurva standar asam p-coumaric.

2.4. Pengukuran tinggi tanaman

Untuk mengetahui dampak pemberian biokontrol pada pertumbuhan tanaman pisang, maka dilakukan pengukuran tinggi tanaman pisang Cavendish pada hari ke-0, 14 dan 30 setelah penanaman.

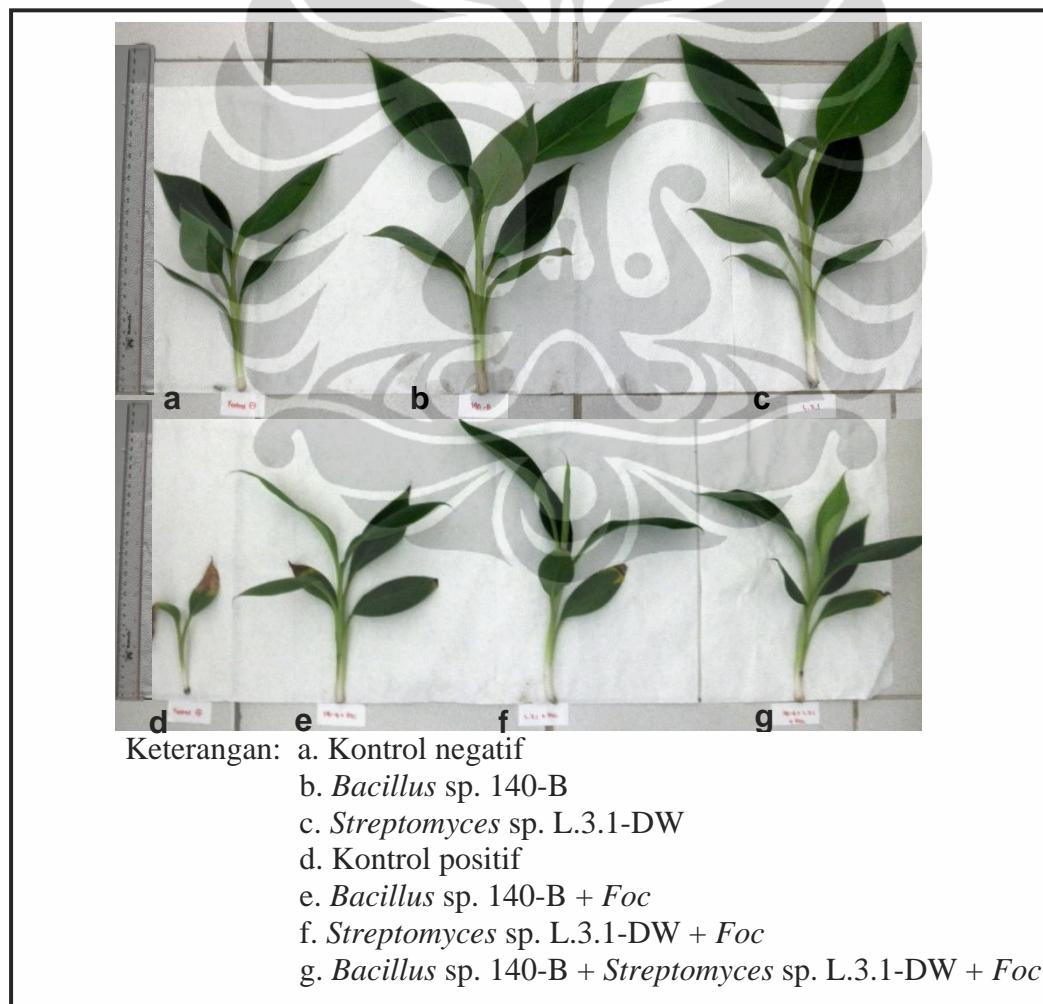
3. Analisis data

Analisis data menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan hasil uji bakteri agen biokontrol secara *in vivo* pada tingkat infeksi *Foc*, populasi *Foc*, aktivitas PAL dan TAL pada tanaman pisang yang diinfeksi *Foc*, serta tinggi tanaman pisang percobaan di rumah kaca.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengukuran tingkat infeksi *Foc* pada tanaman pisang

Aplikasi bakteri agen biokontrol pada tanaman pisang menunjukkan hasil yang positif, dengan gejala infeksi *Foc* yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif. Pada tanaman kontrol positif, infeksi *Foc* menyebabkan kematian tanaman, sedangkan pada tanaman yang diberi bakteri biokontrol, gejala *Fusarium* ditunjukkan dengan adanya daun yang layu dan menguning (Gambar II.1). Gejala daun layu dan menguning pada tanaman pisang mulai muncul pada daun terbawah sekitar 2 minggu setelah tanaman diinfeksi *Foc*. Gejala infeksi *Foc* kemudian menyebar ke beberapa daun di atasnya dan pada hari ke-30 ditemukan tanaman kontrol positif yang mati.

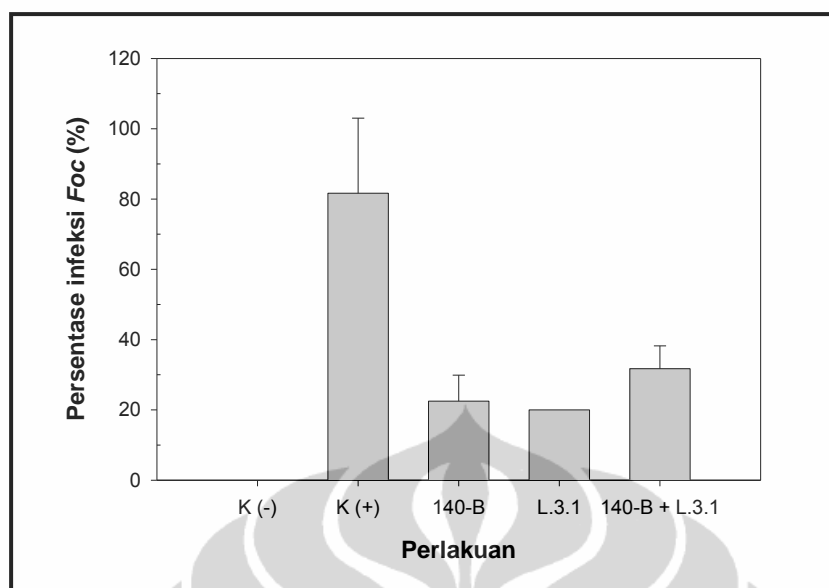


Gambar II.1. Morfologi tanaman pisang di rumah kaca (Dokumentasi Laboratorium Ekofisiologi P2 Biologi LIPI)

Berdasarkan hasil pengamatan di rumah kaca pada penelitian ini, dapat diketahui bahwa infeksi patogen *Foc* pada tanaman pisang Cavendish akan memunculkan gejala daun layu dan menguning, serta menyebabkan kematian tanaman. Daly *et al.* (2006) melaporkan bahwa perkembangan gejala infeksi *Foc* pada tanaman pisang melalui suatu proses yang kompleks yang terdiri dari lima tahapan. Tahapan infeksi *Foc* dimulai dengan pengenalan sinyal *Foc* oleh akar tanaman. Spora *Foc* di tanah akan bergerminasi dan tumbuh di dekat akar tanaman pisang karena merespon senyawa kimia yang dikeluarkan oleh akar, kemudian *Foc* menyerang permukaan akar dan melakukan penetrasi hifanya ke dalam jaringan akar melalui pembuluh xylem. Selanjutnya hifa tersebut akan masuk ke jaringan korteks dan mendegradasi sistem pertahanan di jaringan akar. Hifa *Foc* selanjutnya akan berploriferasi dan menghasilkan mikrokonidium dalam jaringan xylem, serta mensekresikan toksin dan enzim hidrolisis yang menyebabkan kerusakan jaringan akar tanaman pisang (Salerno *et al.* 2000; Di Pietro *et al.* 2003; Mak *et al.* 2004).

Pada penelitian sebelumnya, dilaporkan lebih lanjut, di mana ketika terjadi infeksi *Foc*, tanaman pisang membentuk mekanisme pertahanan diri untuk mencegah penyebaran infeksi ke seluruh jaringan tumbuhan. Tanaman akan mensekresikan gel yang diikuti dengan pembentukan tylose dalam saluran pembuluhnya yang telah terinfeksi hifa *Foc*. Akibatnya, jaringan xylem tertutup oleh hifa *Foc* dan tylose yang menyebabkan *Foc* mensekresikan enzim dan asam fusaric. Hal tersebut akan menghalangi pergerakan air ke bagian atas tanaman dan memicu munculnya gejala *Foc* pada tanaman pisang, yaitu daun menguning, layu, dan pada akhirnya tanaman akan mati (Salerno *et al.* 2000; Daly *et al.* 2006; Leong *et al.* 2009).

Aplikasi agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya berpengaruh terhadap tingkat infeksi *Foc* pada tanaman pisang. Persentase tingkat infeksi *Foc* Pada tanaman pisang yang diberi agen biokontrol lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Gambar II.2).



Gambar II.2. Persentase infeksi *Foc* pada tanaman pisang Cavendish

Pemberian bakteri biokontrol memberikan dampak yang signifikan terhadap penurunan infeksi *Foc* pada tanaman pisang dibandingkan dengan kontrol positif (Tabel II.1). Pemberian bakteri agen biokontrol mampu menekan infeksi *Foc* sekitar 49,94 – 60% dibandingkan kontrol. Berdasarkan hasil perhitungan persentase infeksi *Foc* pada tanaman pisang, maka dapat ditentukan klasifikasi tingkat infeksi *Foc* berdasarkan Hervas *et al.* (1997) yang ditunjukkan pada Tabel II.1.

Tabel II.1. Klasifikasi tingkat infeksi *Foc* pada tanaman pisang Cavendish

Perlakuan	Tingkat infeksi (%)	Skala klasifikasi
Kontrol negatif	0,00 ^a	0
Kontrol positif	81,67 ^c	3
140-B + <i>Foc</i>	22,50 ^{a,b}	1
L.3.1-DW + <i>Foc</i>	20,00 ^{a,b}	1
140-B + L.3.1-DW + <i>Foc</i>	31,73 ^b	1

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata dengan uji Tukey ($\alpha = 0.05$).

Berdasarkan hasil penelitian di rumah kaca diketahui *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan menekan infeksi *Foc* lebih baik tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan biokontrol lainnya. Hal tersebut ditunjukkan

dengan persentase tingkat infeksi terendah, kemudian diikuti oleh perlakuan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasi kedua bakteri. Besarnya persentase infeksi *Foc* pada tanaman pisang dalam penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan bakteri biokontrol sebagai isolat tunggal memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan kombinasi. Berdasarkan Tabel II.1, diketahui bahwa masih terdapat infeksi *Foc* pada tanaman pisang, hal tersebut dikarenakan aplikasi bakteri agen biokontrol bersifat pencegahan dengan menurunkan tingkat infeksi, bukan menghilangkan infeksi *Foc*. Tingkat infeksi *Foc* pada percobaan *in-vivo* ini dapat dikorelasikan dengan hasil penelitian penghambatan *Foc* oleh *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW secara *in-vitro*, di mana *Streptomyces* sp. L.3.1-DW juga memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B.

Kelebihan *Streptomyces* sp. dalam mengendalikan infeksi patogen dikarenakan bakteri tersebut memiliki kemampuan khusus untuk bertahan hidup di lingkungan yang kompetitif dengan menghasilkan antibiotik yang turut berperan dalam menghambat pertumbuhan patogen *Foc* di perakaran tanaman pisang (Miyadoh 1993; Tanaka & Omura 1993; Suzuki 2000; Berdy 2005; Khamna *et al.* 2009). *Streptomyces* sp. juga dapat membentuk hifa yang sangat baik di tanah dan area rizosfer yang berperan penting untuk melindungi perakaran tanaman terhadap infeksi *Foc* (Reponen *et al.* 1998; Benizri *et al.* 2001; de Vasconcellos & Cardoso 2009). *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki hifa yang mampu mengabsorpsi nutrisi lebih banyak dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B sehingga memiliki kemampuan berkompetisi yang lebih baik terhadap patogen *Foc* di area rizosfer tanaman. Kemampuan absorpsi nutrisi yang lebih baik tersebut dikarenakan hifa memiliki luas permukaan yang lebih besar dibandingkan sel bakteri.

Kemampuan *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW dalam mengendalikan infeksi *Foc* pada tanaman pisang dipengaruhi oleh kemampuan beradaptasi yang baik di tempat mereka diaplikasikan (Rodas-Junco *et al.* 2009). Media pasir yang digunakan dalam penelitian di rumah kaca merupakan habitat yang tidak menguntungkan secara fisik, kimia maupun biologi, tetapi kedua bakteri tersebut mampu beradaptasi dan berkompetisi dengan patogen *Foc*.

Bacillus sp. dan *Streptomyces* sp. merupakan bakteri yang menghasilkan spora yang tahan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim dan miskin nutrisi (Basha & Ulaganathan 2002; Madigan & Martinko 2011; Earl *et al.* 2008). *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. yang diaplikasikan ke tanaman akan cepat berkolonisasi dengan jaringan perakaran tanaman, kemudian masuk menuju pembuluh stele dan menginduksi sistem pertahanan untuk melawan patogen *Foc* (Benhamou *et al.* 1996; Akhtar *et al.* 2008). Kedua bakteri tersebut juga diketahui mampu mensekresikan enzim hidrolase, seperti protease dan kitinase yang berpotensi dalam melisis dinding sel jamur patogen *Foc*, sehingga pertumbuhan *Foc* pada tanaman pisang akan terhambat (Gomes *et al.* 2000; de Azaredo *et al.* 2004; Rodas-Junco *et al.* 2009). Dalam mengendalikan infeksi *Foc* pada tanaman pisang, *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. juga menghasilkan senyawa antifungal yang dapat menghidrolisis asam fusaric yang dihasilkan oleh *Foc* (Benyagoub *et al.* 1998; Getha & Vikineswary 2002; Compant *et al.* 2005).

2. Pengukuran populasi *Foc* pada area rizosfer tanaman pisang setelah pemberian agen biokontrol

Pengukuran populasi *Foc* di area rizosfer tanaman pisang dilakukan dengan sampling tanah pada saat tanaman pisang berumur 14 dan 30 hari. Hasil penelitian aplikasi biokontrol pada tanaman pisang di rumah kaca menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW serta kombinasinya mampu menurunkan populasi *Foc* di area rizosfer tanaman pisang. Berdasarkan hasil *plate count* dan penghitungan koloni, populasi *Foc* tertinggi ditemukan di area rizosfer tanaman pisang kontrol positif yang tidak diberi bakteri biokontrol (Tabel II.2).

Tabel II.2. Populasi *Foc* di area rizosfer tanaman pisang Cavendish

Perlakuan	Populasi <i>Foc</i> (10^5 CFU/ml)		
	Hari ke-0	Hari ke-14	Hari ke-30
Kontrol (+)	50,00 ^a	28,75 ^b	21,25 ^b
140-B + <i>Foc</i>	50,00 ^a	10,00 ^{a,b}	7,50 ^a
L.3.1-DW + <i>Foc</i>	50,00 ^a	8,75 ^a	6,25 ^a
140-B + L.3.1-DW + <i>Foc</i>	50,00 ^a	10,00 ^{a,b}	8,75 ^a

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata dengan uji Tukey ($\alpha = 0.05$).

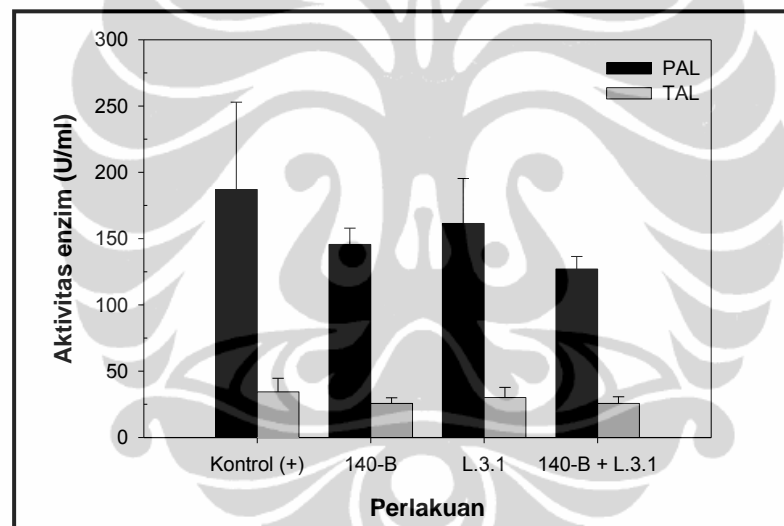
Berdasarkan Tabel II.2, diketahui bahwa populasi *Foc* mengalami penurunan pada semua perlakuan. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kondisi media pasir yang digunakan tidak dapat mendukung pertumbuhan *Foc*. Kapang patogen *Foc* yang diinokulasikan tidak mampu beradaptasi dengan optimal di media pasir yang miskin unsur hara, sehingga populasinya menurun. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW cenderung memiliki kompetisi dengan patogen *Foc* lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasinya. Area rizosfer tanaman pisang yang diberi *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki populasi *Foc* paling sedikit, kemudian diikuti dengan perlakuan pemberian agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasinya. Pengukuran populasi *Foc* pada hari ke-14 menunjukkan hasil perlakuan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW tidak berbeda signifikan dengan perlakuan kontrol. Namun, pada hari ke-30, pemberian biokontrol mampu menekan populasi *Foc* di area rizosfer tanaman, dan menunjukkan hasil yang berbeda signifikan terhadap perlakuan kontrol.

Potensi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW untuk menghambat pertumbuhan dan menurunkan populasi *Foc* dipengaruhi oleh kemampuannya untuk berkompetisi dengan patogen *Foc* di area rizosfer tanaman pisang. Kompetensi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol terhadap *Foc* meliputi kemampuan kolonisasi pada akar tanaman secara efektif dan dikombinasikan dengan kemampuan untuk bertahan hidup dan berproliferasi selama masa pertumbuhan akar tanaman (Lugtenberg & Dekkers 1999; Compant *et al.* 2005). Aktivitas antagosome bakteri biokontrol terhadap *Foc* di tanaman dilakukan dengan beberapa mekanisme, antara lain: 1). kompetisi nutrisi, oksigen, dan habitat; 2). parasitisme, dengan menghasilkan enzim hidrolase seperti kitinase, protease dan β -1-3 glucanase yang berperan dalam melisiskan dinding sel jamur patogen; 3). sekresi senyawa antibiotik atau senyawa antifungal lainnya yang dapat menghambat pertumbuhan *Foc*; 4). menginduksi sistem ketahanan tanaman (Benyagoub *et al.* 1998; Gomes *et al.* 2000; Getha & Vikineswary 2002; de Azaredo *et al.* 2004; Monteiro *et al.* 2005; Nourozian *et al.* 2006; Prapagdee *et al.* 2008; Rodas-Junco *et al.* 2009). Aktivitas antagonistik dari *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. terhadap patogen berhubungan erat dengan

kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antifungal dan enzim hidrolase ekstraseluler (Ouchdouch *et al.* 2001; Getha & Vikineswary 2002; Kim *et al.* 2003; Fguira *et al.* 2005; Taechowisan *et al.* 2005).

3. Aktivitas enzimatik yang terkait dengan resistensi tanaman terhadap infeksi *Foc* (PAL dan TAL)

Analisis enzim Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) dan Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL) dilakukan dengan ekstraksi sampel akar tanaman pisang setelah masa pengamatan di rumah kaca selesai. Pengukuran aktivitas enzim PAL dan TAL pada tanaman pisang percobaan di rumah kaca menunjukkan hasil bervariasi (Gambar II.3).



Gambar II.3. Aktivitas enzim resistensi PAL dan TAL tanaman pisang pada aplikasi agen biokontrol di rumah kaca

Tanaman pisang dengan perlakuan kontrol memiliki rata-rata aktivitas enzim PAL dan TAL yang cenderung lebih tinggi tetapi tidak berbeda signifikan dengan tanaman yang diberi bakteri biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW maupun kombinasinya (Tabel II.3).

Tabel II.3. Aktivitas enzim PAL dan TAL pada tanaman pisang percobaan aplikasi biokontrol di rumah kaca

Perlakuan	Aktivitas enzim (U/ml)	
	Enzim PAL	Enzim TAL
Kontrol (+)	187,04 ^a	34,47 ^a
140-B + <i>Foc</i>	145,58 ^a	25,72 ^a
L.3.1-DW + <i>Foc</i>	161,42 ^a	30,16 ^a
140-B + L.3.1-DW + <i>Foc</i>	127,04 ^a	25,69 ^a

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata dengan uji Tukey ($\alpha = 0.05$).

Berdasarkan Tabel II.3, hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman kontrol cenderung menghasilkan enzim PAL dan TAL lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang diberi perlakuan biokontrol, tetapi tidak signifikan. Hasil penelitian dari Gnanamangai *et al.* (2011) juga menunjukkan hal yang sama, di mana tanaman yang terinfeksi patogen menghasilkan aktivitas enzim PAL dan TAL yang lebih tinggi dibandingkan tanaman yang sehat. Pada perlakuan pemberian biokontrol, diketahui bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan menghasilkan enzim PAL dan TAL lebih tinggi dibandingkan perlakuan biokontrol lainnya. Aktivitas PAL dari perlakuan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebesar 161,42 U/ml, diikuti oleh perlakuan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasinya. Pada aktivitas enzim TAL juga menunjukkan hal yang sama, di mana aktivitas TAL tertinggi dari *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebesar 30,16 U/ml, diikuti oleh perlakuan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasinya. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa aktivitas enzim PAL lebih tinggi dibandingkan enzim TAL. Beberapa hasil penelitian lainnya tentang aktivitas enzim PAL dan TAL pada tanaman buah kiwi dan teh, juga menunjukkan hal yang sama, di mana aktivitas enzim TAL lebih rendah dibanding PAL (Reglinski *et al.* 2001; Chakraborty & Chakraborty 2005; Gnanamangai *et al.* 2011).

Hasil dari aktivitas enzim PAL dan TAL pada tanaman pisang dalam penelitian ini dapat juga dipengaruhi oleh periode pengukurannya. Dalam penelitian ini, pengukuran aktivitas PAL dan TAL hanya dilakukan satu kali pada akhir waktu penelitian sehingga tidak dapat mencerminkan keseluruhan aktivitasnya. Pengukuran aktivitas PAL dan TAL sebaiknya dilakukan secara periodik sejak terjadi gejala infeksi untuk mengetahui laju peningkatan aktivitasnya. Gejala infeksi *Foc* pertama kali ditemukan pada hari ke-14 setelah

perlakuan, tetapi pengukuran aktivitas PAL dan TAL hanya dilakukan satu kali pada hari ke-30. Beberapa penelitian telah melakukan pengukuran aktivitas PAL dan TAL secara periodik dan menunjukkan adanya peningkatan selama waktu inkubasi, tetapi kemudian terjadi penurunan aktivitas setelah periode tertentu. Khan *et al.* 2003 melakukan pengukuran aktivitas PAL dan TAL dalam rentang waktu 12 – 72 jam, di mana aktivitas PAL dan TAL tertinggi pada jam ke-36, kemudian mengalami penurunan pada jam ke-48. Christopher *et al.* juga melakukan pengukuran aktivitas PAL dalam rentang waktu 0 – 15 hari, dan hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas PAL meningkat sampai pada hari ke-9 dan mengalami penurunan pada hari ke-12 setelah perlakuan.

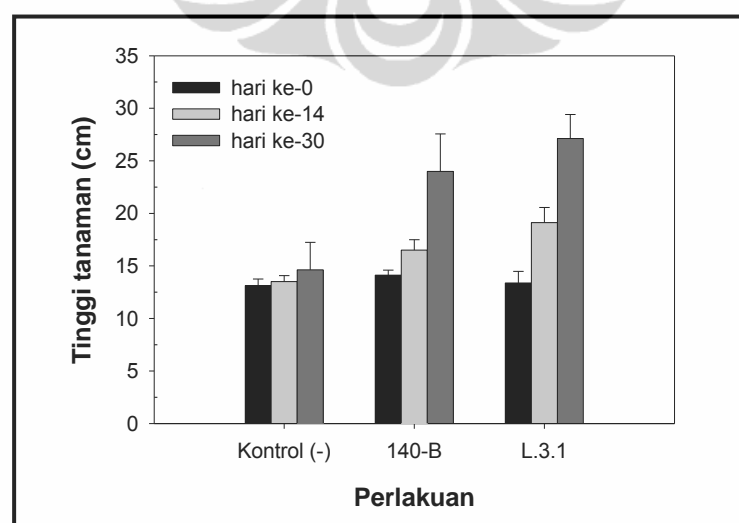
Infeksi *Foc* pada tanaman akan memicu tanaman untuk meningkatkan mekanisme pertahanannya terhadap *Foc*, yaitu dengan menghasilkan enzim-enzim ketahanan seperti enzim Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) dan Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL) (Ebel 1986; Khan *et al.* 2003). Aktivitas enzim PAL dan TAL merupakan salah satu respon awal dari tanaman pisang untuk melawan infeksi patogen *Foc* (Khan *et al.* 2003). Tingkat aktivitas PAL kemungkinan berbeda pada tiap-tiap tanaman, bergantung pada tahapan pertumbuhan tanaman, genotip dan kondisi lingkungan (Dixon & Paiva 1995). Peningkatan aktivitas PAL dan TAL sering digunakan sebagai indikator peningkatan sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen dan kondisi habitat yang kekurangan nutrisi (Khan *et al.* 2003). PAL dan TAL merupakan dua enzim kunci dalam jalur metabolisme phenylpropanoid, dengan produk akhir berupa senyawa fenol yang berkaitan erat dengan ekspresi ketahanan tanaman terhadap patogen (Nicholson & Hammerschmidt 1992). PAL mengkatalisis konversi L-phenylalanine menjadi *trans*-cinnamic acid, sedangkan TAL mengkatalisis konversi L-tyrosine menjadi ammonia dan p-coumaric acid (Beaudoin-Eagan & Thorpe 1985). Senyawa fenol hasil metabolisme phenylpropanoid diketahui memiliki peranan penting dalam sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Gnanamangai *et al.* 2011).

Aktivitas enzim PAL dan TAL juga berkaitan dengan produksi hormon tumbuh, seperti auksin dan sitokinin. *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diketahui mampu menghasilkan hormon tumbuh auksin (IAA) sehingga dapat memicu tanaman untuk meningkatkan aktivitas enzim PAL dan

TAL. Hormon tumbuh IAA yang dihasilkan oleh kedua bakteri tersebut mampu meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen dan memacu pertumbuhan tanaman (Cattelan *et al.* 1999; Shaharoon *et al.* 2006; Egamberdiyeva 2007; Ashrafuzzaman *et al.* 2009; Jossi & Bath 2011). Dalam penelitian ini, *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki aktivitas PAL dan TAL lebih tinggi dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasinya. Hal tersebut dapat dihubungkan dengan kadar IAA yang dihasilkan oleh kedua bakteri tersebut, di mana *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kadar hormon IAA lebih tinggi dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B. Beaudoin-Eagen dan Thorpe (1985) juga menyebutkan adanya keseimbangan antara produksi senyawa fenol dengan hormon tumbuh IAA. Semakin besar produksi hormon tumbuh IAA, maka senyawa fenol yang dihasilkan juga semakin besar.

4. Pengukuran tinggi tanaman pisang Cavendish

Pengukuran tinggi tanaman pisang dilakukan pada hari ke-0, 14 dan 30 setelah penanaman pisang. Pemberian agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya berpengaruh pada pertumbuhan tanaman. Tanaman pisang tanpa infeksi *Foc* yang diberi agen biokontrol memiliki rata-rata tinggi tanaman yang lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol (Gambar II.4).



Gambar II.4. Tinggi tanaman pisang Cavendish dengan aplikasi bakteri biokontrol tanpa infeksi *Foc*

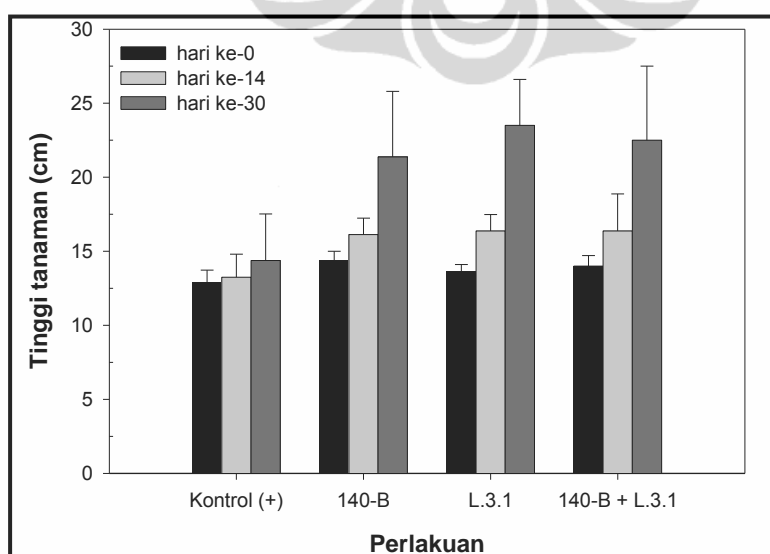
Tanaman pisang tanpa infeksi *Foc* yang diberi agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki rata-rata tinggi yang berbeda signifikan dengan tanaman kontrol setelah perlakuan pada hari ke-14 dan 30 (Tabel II.4). *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan meningkatkan pertumbuhan tanaman lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Tanaman dengan perlakuan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki tinggi tanaman tertinggi, yaitu 24,00 cm, kemudian diikuti oleh perlakuan *Bacillus* sp. 140-B dan kontrol.

Tabel II.4. Tinggi tanaman pisang tanpa inokulasi *Foc*

Perlakuan	Hari ke-		
	0	14	30
Kontrol (-)	13,13 ^a	13,5 ^a	14,63 ^a
140-B	14,13 ^a	16,5 ^b	24,00 ^b
L.3.1	13,38 ^a	19,13 ^c	27,13 ^b

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata dengan uji Tukey ($\alpha = 0.05$).

Hasil yang sama juga ditunjukkan pada tanaman pisang yang diinfeksi *Foc*, di mana tanaman pisang yang diberi agen biokontrol memiliki rata-rata tinggi yang lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol (Gambar II.5). Aplikasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman pisang.



Gambar II.5. Tinggi tanaman pisang Cavendish dengan aplikasi bakteri biokontrol dan diinfeksi *Foc*

Tanaman pisang yang diinfeksi *Foc* dan diberi agen biokontrol *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki rata-rata tinggi yang berbeda signifikan dengan tanaman kontrol setelah perlakuan pada hari ke-30, sedangkan perlakuan dengan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kontrol (Tabel II.5). *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan meningkatkan pertumbuhan tanaman lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Tanaman dengan perlakuan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki tinggi tanaman tertinggi, yaitu 23,50 cm, kemudian diikuti oleh perlakuan kombinasi, *Bacillus* sp. 140-B dan kontrol.

Tabel II.5. Tinggi tanaman pisang yang diinokulasi *Foc*

Perlakuan	Hari ke-		
	0	14	30
Kontrol (+)	12,88 ^a	13,25 ^a	14,38 ^a
140-B + <i>Foc</i>	14,38 ^b	16,13 ^a	21,38 ^{a,b}
L.3.1 + <i>Foc</i>	13,63 ^{a,b}	16,38 ^a	23,5 ^b
140-B + L.3.1 + <i>Foc</i>	14,00 ^{a,b}	16,38 ^a	22,5 ^{a,b}

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata dengan uji Tukey ($\alpha = 0.05$).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berpotensi sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan infeksi *Foc* sekaligus meningkatkan pertumbuhan tanaman pisang. Pertambahan tinggi tanaman yang diberi perlakuan biokontrol lebih baik dibandingkan tanaman kontrol. Kemampuan untuk memacu pertumbuhan tanaman didukung oleh kemampuan beradaptasi yang baik di media pasir. Bakteri biokontrol mampu bertahan hidup dan berkompetisi dengan patogen, kemudian masuk ke jaringan tanaman dan berperan untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman pisang. *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. diketahui memiliki kemampuan dalam memacu pertumbuhan tanaman karena adanya rangsangan dari eksudat akar tanaman. Bakteri rizosfer seperti *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. memanfaatkan eksudat akar tanaman untuk pertumbuhannya dan mensintesis senyawa antifungal untuk melawan patogen tanaman (Tokala *et al.* 2002; Abd-Allah *et al.* 2007)

Sebagai bakteri agen biokontrol, *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. juga diketahui mampu memacu peningkatan pertumbuhan tanaman atau dikenal dengan *plant growth-promoting bacteria* (PGPR) (Glick *et al.* 2001; Tokala *et al.* 2002; Merzaeva & Shirokikh 2006; Akgul & Mirik 2008). PGPR merupakan kolonisasi bakteri dengan akar tanaman yang sangat efektif dalam mempertahankan tanaman dari infeksi patogen dan meningkatkan pertumbuhan tanaman (Akhtar *et al.* 2008). PGPR memberikan dampak pada pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan siklus nutrisi, menekan patogen dan menghasilkan senyawa biologi aktif (Khalid *et al.* 2004). Dampak PGPR sangat menguntungkan bagi tanaman dalam melawan patogen, karena menghasilkan senyawa antifungal yang dapat meningkatkan resistensi tanaman terhadap infeksi patogen meskipun dalam kondisi lingkungan yang kurang nutrisi (Sid Ahmed *et al.* 2000; Ramamoorthy *et al.* 2001; Dey *et al.* 2004; Compant *et al.* 2005; Herman *et al.* 2008; Minorsky *et al.* 2008).

Kolonisasi PGPR dengan perakaran tanaman memberikan dampak menguntungkan bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui beberapa mekanisme. Mekanisme-mekanisme tersebut antara lain dengan menghasilkan fitohormon, seperti IAA, giberelin, sitokinin dan etilen; kemampuan fiksasi N₂ bebas; melawan patogen dengan mensintesis antibiotik, produksi enzim-enzim, senyawa antifungal dan siderofor yang berperan mengatasi keterbatasan unsur Fe di lingkungan; kemampuan melarutkan mineral fosfat dan nutrisi lainnya; dan memacu tanaman dalam pengambilan nutrisi di lingkungan (Cattelan *et al.* 1999; Mrkovacki & Milic 2001; Bharathi *et al.* 2004; Jeun *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2006; Salantur *et al.* 2006; Shaharoon *et al.* 2006; Siddiqui 2006; Egamberdiyeva 2007; Ashrafuzzaman *et al.* 2009). Hormon tumbuh IAA yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berfungsi sebagai sinyal molekuler yang penting dalam regulasi perkembangan tanaman dan memacu perkembangan perakaran tanaman inang (Ashrafuzzaman *et al.* 2009; Jossi & Bath 2011). Kemampuan PGPR dalam melarutkan fosfat memiliki peranan yang penting karena dapat meningkatkan ketersediaan unsur fosfat dan besi untuk pertumbuhan tanaman (Verma *et al.* 2001; Ashrafuzzaman *et al.* 2009; Jossi & Bath 2011).

KESIMPULAN

Aplikasi agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW serta kombinasinya memiliki dampak yang signifikan pada tanaman pisang Cavendish yang diinokulasi dengan patogen *Foc*. Perlakuan pemberian agen biokontrol mampu menekan infeksi *Foc* pada tanaman pisang, menurunkan populasi *Foc* di area rizosfer tanaman, menghasilkan aktivitas enzim ketahanan tanaman (PAL dan TAL), serta meningkatkan pertumbuhan tanaman yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman kontrol. Pemberian *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal menunjukkan kecenderungan sebagai agen biokontrol yang lebih baik dibandingkan dengan *Bacillus* sp. 140-B maupun kombinasi keduanya. Persentase infeksi *Foc* di tanaman pisang yang paling rendah ditunjukkan pada perlakuan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW, yaitu 20,00%, kemudian diikuti oleh perlakuan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasi. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW menurunkan populasi *Foc* paling baik dibandingkan perlakuan biokontrol lainnya, yaitu $6,25 \times 10^5$ CFU/ml. Pada aktivitas enzim PAL dan TAL, perlakuan kontrol dengan tingkat infeksi *Foc* yang lebih tinggi menghasilkan enzim PAL dan TAL lebih tinggi dibandingkan perlakuan biokontrol. Sedangkan pada perlakuan biokontrol, *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki aktivitas enzim PAL dan TAL lebih tinggi dibandingkan perlakuan biokontrol lainnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berpotensi sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan infeksi patogen *Foc* serta dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman pisang, di mana perlakuan dengan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki rata-rata tinggi tanaman paling besar dibandingkan perlakuan lainnya. Perlakuan pemberian bakteri biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal memberikan dampak yang lebih baik dibandingkan dengan kombinasinya. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki keunggulan karena selain berpotensi sebagai agen biokontrol, juga berpotensi sebagai agen *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

SARAN

1. Untuk mengetahui dampak pemberian bakteri biokontrol terhadap tanaman yang diinfeksi patogen *Foc*, perlakuan aplikasi biokontrol dapat dilakukan dengan meningkatkan kepadatan sel bakteri agen biokontrol supaya diperoleh hasil yang signifikan.
2. Pengukuran aktivitas enzim PAL dan TAL perlu dilakukan secara periodik, sehingga dapat mencerminkan sistem ketahanan tanaman pisang yang terinfeksi patogen *Foc*.

DAFTAR ACUAN

- Abd-Allah, E.F., S.M. Ezzat & M.R. Tohamy. 2007. *Bacillus subtilis* as an alternative biologically based strategy for controlling *Fusarium* wilt disease in tomato: A histological study. *Phytopathology*, **35**(5): 474--478.
- Ahmad, F., I. Ahmad & M.S. Khan. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research*, **36**: 1--9.
- Akgul, D.S. & M. Mirik. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology*, **90**(1): 29--34.
- Akhtar, M.S., U. Shakeel & Z.A. Siddiqui. 2008. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkey Journal Biology*, **34**: 1--7.
- Anitha, A. & M. Rabeeth. 2009. Control of *Fusarium* wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. *African Journal of Basic and Applied Sciences*, **1**(1-2): 9--14.
- Asaka, O. & M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(11): 4081--4085.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, M.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah & S. Meon. 2009. Efficiency of plant growth-promoting

- rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, **8**(7): 1247--1252.
- Basha, S. & K. Ulaganathan. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science*, **82**(12): 1457--1463.
- Bastasa, G.N. & A.A. Balliad. 2005. Biological control of Fusarium wilt of abaca (*Fusarium oxysporum*) with *Trichoderma* and yeast. *Philippines Journal Corps Science*, **30**: 29--37.
- Beaudoin-Eagan, L.D. & T.A. Thorpe. 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, **78**: 438--441.
- Benhamou, N., J.W. Kloepper, A. Qualdt-Hallman & S. Tuzun. 1996. Induction of defence-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, **112**: 919--926.
- Benizri, E., E. Baudoin & A. Guckert. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science Technology*, **11**: 557--574.
- Benyagoub, M., N. Benhamou & O. Carisse. 1998. Cytochemical investigation of the antagonistic interaction between a *Microsphaeropsis* sp. (isolate P130A) and *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **88**: 605--613.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal Antibiotic*, **58**:1--26.
- Bharathi, R., R. Vivekanathan, S. Harish, A. Ramanathan & R. Samiyappan. 2004. Rhizobacteria-based bio-formulation for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, **23**: 835--843.
- Cattelan, A.J., P.G. Hartel & J.J. Fuhrmann. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society for America*, **63**: 1670--1680.
- Chakraborty, U. & N. Chakraborty. 2005. Impact of environmental factors on infestation of tea leaves by *Helopeltis theivora* and associated changes in flavonoid flavor components and enzyme activities. *Phytoparasitica*, **33**: 88--96.
- Christopher, D.J., T.S. Raj, S.U. Rani & R. Udhayakumar. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against

- Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Biopesticides*, **3**: 158--162.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement & E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospect. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(9): 4951--4959.
- Daly, A., G. Walduck & Darwin. 2006. *Fusarium* wilt of bananas (Panama disease). *Northern Territory Government*, **151**: 1--5.
- de Azeredo, L.A.I., D.M.G. Freire, R.M.A. Soares, S.G.F. Leite & R.R.R. Coelho. 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbiology Technology*, **34**: 354--358.
- de Vasconcellos, R.L.F. & E.J.B.N. Cardoso. 2009. Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol*, **54**: 807--816.
- Dey, R., K.K. Pal, D.M. Bath & S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology Research*, **159**: 371--394.
- Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Souza & G.H.J. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology*, **10**: 1--10.
- Di Pietro, A., M.P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana & M.I.G. Roncero. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 315--325.
- Dixon, R.A. & N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**: 1085--1097.
- Earl, A.M., R. Losick & R. Kolter. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, **16**(6): 269--275.
- Ebel, J. 1986. Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annual Review Phytopathology*, **24**: 235--264.

- Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, **36**: 184--189.
- El-Tharabily, K.A., M.H. Soliman, A.H. Nassar, H.A. Al-Hassani, K. Sivasithamparam, F. Mckenna & G.E. St. J. Hardy. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*, **49**: 573--583.
- Fguira, L.F., S. Fotso, R.B. Amer-Mehdi, L. Mellouli & H. Laatsch. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*, **156**: 341--347.
- Getha, K. & S. Vikineswary. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**: 303--310.
- Glick, B.R., D.M. Penrose & W. Ma. 2001. Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advanced*, **19**: 135--138.
- Gnanamangai, B.M., P. Ponmurugan, R. Yazhini & S.K. Pragadeesh. 2011. PR enzyme activities of *Cercospora theae* causing bird's eye spot disease in tea plants (*Camelia canensis* (L.) O.kuntze). *Plant Pathology Journal*, **10**(1): 13--21.
- Gomes, R.C., L.T.A.S. Semedo, R.M.A. Soares, C.S. Alviano, L.F. Linhares & R.R.R. Coelho. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letter Applied Microbiology*, **30**: 146--150.
- Herman, M.A.B., B.A. Nault & C.D. Smart. 2008. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection*, **27**: 996--1002.
- Hervas, A., B. Linda & R.M. Jimenez-Diaz. 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal Plant Pathology*, **103**: 631--642.

- Hwang, S.C. & W.H. Ko. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*, **88**: 580--588.
- Ishii, H. 2004. Studies on fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Journal Genetic Plant Pathology*, **7**: 379--386.
- Jeun. Y.C., K.S. Park, C.H. Kim, W.D. Fowler & J.W. Kloepper. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, **29**: 34--42.
- Joo, G.J. 2005. Production of an antifungal substance of biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letter*, **27**: 201--205.
- Joshi, P. & A.B. Bath. 2011. Diversity and function of plant growth-promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalaya Region. *International Journal of Environmental Sciences*, **1**(6): 1135--1143.
- Jumjunidang, Riska & A. Soemargono. 2012. Identification and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates through analysis of vegetative compatibility group in Lampung Province, Indonesia. *ARPN Journal of Agriculture and Biological Science*, **7**(4): 279--284.
- Khalid, A., M. Arshad & Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, **96**: 473--480.
- Khamna, S., A. Yokota, J.F. Peberdy & S. Lumyong. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from rizhosphere Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology*, **6**(3): 143--147.
- Khan, W., B. Prit hiviraj & D.L. Smith. 2003. Chitosan and Chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal Plant Physiology*, **160**: 859--863.
- Kim, H.S., J. Park, S.W. Choi, K.H. Choi, G.P. Lee, S.J. Ban, C.H. Lee & C.S. Kim. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology*, **41**(3): 196--201.

- Kumar, H.B., A.C.U. Shankar, S.C. Nayaka, K.R. Kini, H.S. Shetty & H.S. Prakash. 2010. Biochemical characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from India. *African Journal of Biotechnology*, **9**(4): 523--530.
- Laili, N. & S. Antonius. 2009. Potensi aktinomisetes indigenous Malinau sebagai agen biokontrol untuk mendukung pertanian yang berwawasan lingkungan di Malinau Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional Biologi 7 ITS Surabaya 07 Nopember 2009*. 219--227.
- Leong, S.K., Z. Latiffah & S. Baharuddin. 2009. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. *American Journal of Applied Sciences*, **6**(7): 1301--1307.
- Lugtenberg, B.J.J. & L.C. Dekkers. 1999. What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environmental Microbiology*, **1**: 9--13.
- Madigan, M.T. & J.M. Martinko. 2011. *Brock Biology of Microorganism*. Pearson Prentice Hall, USA: xxv + 992 hlm.
- Mak, C., A.A. Mohamed, K.W. Liew & Y.W. Ho. 2004. Early screening tehcnique for *Fusarium* wilt resistance in banana micropropagated plants. Banana improvement. *FAO Corporate Document Respiratory*.
- Merzaeva, O.V. & I.G. Shirokikh. 2006. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. *Microbiology*, **75**: 226--230.
- Minorsky, P.V. 2008. On the side. *Plant Physiology*, **146**: 323--324.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*, **7**: 100--106.
- Molina, A.B., R.C. Williams, C. Hermanto, Suwanda, B. Komolong & P. Kokoa. 2010. Mitigating the threat of banana *Fusarium* wilt: understanding the agroecological distribution of pathogenic forms and developing disease management strategies. *Australian Center for International Agriculture Research*, Final Report: 1--76.
- Monteiro, L., R.dL.R. Mariano & A.M. Santo-Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. againts *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technolgy*, **48**(1): 23--29.

- Mrkovacki, N. & V. Milic. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agriculture application. *Annual Microbiology*, **51**: 145--158.
- Nasir, N. & Jumjunidang. 2002. Strategi jangka pendek menahan laju perluasan serangan penyakit layu pisang. Seminar Nasional Pengendalian Penyakit Layu Pisang: Mencegah kepunahan, mendukung ketahanan pangan dan agribisnis, 22-23 Oktober 2009.
- Nasir, N. & Jumjunidang. 2003. Karakterisasi ras *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dengan metode *vegetative compatibility group test* dan identifikasi kultivar pisang yang terserang. *Jurnal Hortikultura*, **13**: 276--284.
- Nasir, N., P.A. Pittaway & K.G. Pegg. 2003. Effect of organic amendments and solarisation on *Fusarium* wilt in susceptible banana plantlets, transplanted into naturally infested soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, **54**: 251--257.
- Nicholson, R.L. & R. Hammerschmidt. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review Phytopathology*, **30**: 369--389.
- Nourozian, J., H.R. Etebarian & G. Khodakaramian. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin Journal Science Technology*, **28**(1): 29--38.
- Ouchdouch, Y., M. Barakate & C. Finance. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Journal Soil Biology*, **37**: 69--74.
- Perez-Vicente, L. 2004. *Fusarium* wilt (Panama disease) of bananas: An updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. *XVI Reunion Internacional Acobat*. Playa, Cuba: 1--15.
- Ploetz, R.C. 2000. Panama disease: A classic and destructive disease of banana. Online: *Plant Health Progress*, 10.1094/PHP-2000-1204-01-HM.
- Ploetz, R.C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *The American Phytopathological Society*, **96**(6): 653--656.
- Prapagdee, B., C. Kuekulvong & S. Mongkolsuk. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against

- phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, **4**(5): 330--337.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasan & R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and disease. *Crop Protection*, **20**: 1--11.
- Reglinski, T., G. Whitaker, J.M. Cooney, J.T. Taylor, P.R. Poole, P.B. Roberts & K.K. Kim. 2001. Systemic acquired resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwi fruit vines. *Physiological Molecular Plant Pathology*, **58**: 111--118.
- Reponen, T.A., S.V. Gazonko, A.S. Grinshpun, K. Willeke & E.C. Cole. 1998. Characteristic of airborne actinomycetes spores. *Applied Environmental Microbiology*, **64**: 3807--3812.
- Rodas-Junco, B.A., H.F. Magana-Sevilla, J.M. Tun-Suarez & A. Reyes-Ramirez. 2009. Antifungal activity in vitro of native *Bacillus* sp. strains against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Research Journal of Biological Sciences*, **4**(9): 985--989.
- Salantur, A., A. Ozturk & S. Akten. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environment*, **52**(3): 111--118.
- Salerno, M.I., S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson. 2000. Effects on growth and comparison of root tissue colonization pattern of *Eucalyptus viminalis* and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **146**: 317--324.
- Saravanan, T., M. Muthusamy & T. Marimuthu. 2004a. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on *Fusarium* wilt pathogen in banana rhizosphere. *Journal of Biological Sciences*, **4**(2): 192--198.
- Saravanan, T., R. Bhaskaran & M. Muthusamy. 2004b. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt disease. *Plant Pathology Journal*, **3**(2): 72--80.
- Saravanan, T. & M. Muthusamy. 2006. Influence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder and Hansen on 2,4-diacetylphloroglucinol

- production by *Pseudomonas fluorescens* migula in banana rhizosphere. *Journal of Plant Protection Research*, **46**(3): 241--254.
- Shaharoon, B., M. Arshad, Z.A. Zahir & A. Khalid. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-diaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**: 2971--2975.
- Sid Ahmed, A., C. Perez & M.E. Candela. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsici annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 817--824.
- Siddiqui, Z.A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui, Z.A (ed.). 2006. *Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Amsterdam, 111-142.
- Suzuki, S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetologica*, **14**(2): 27--33.
- Taechowisan, T., C. Lu, Y. Shen & S. Lumyong. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*, **151**: 1691--1695.
- Tanaka Y.T. & S. Omura. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annual Revised Microbiology*, **47**: 57--87.
- Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey & M.J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2161--2171.
- Verma, S.C., J.K. Ladha & A.K. Tripathi. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, **91**: 127--141.
- Xiao, K., L.L. Kinkel & D.A. Samac. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, **23**: 285--295.

DISKUSI PARIPURNA

Bacillus sp. dan *Streptomyces* sp. merupakan bakteri rizosfer yang memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan dan mengendalikan infeksi patogen *Foc* pada tanaman pisang. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua bakteri tersebut mampu mengendalikan infeksi *Foc* dan berperan penting pada kesehatan tanaman. Keberadaan *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. di area rizosfer memiliki arti penting, baik secara kualitatif maupun kuantitatif terhadap pertumbuhan tanaman dan melindungi perakaran tanaman terhadap infeksi kapang patogen (Basha & Ulaganathan 2002; Anita & Rabeeth; de Vasconcellos & Cardoso 2009). *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. juga dilaporkan memiliki aktivitas biokontrol dengan spektrum yang luas, karena mampu menghambat beberapa jenis patogen pada tanaman (El-Tarabily *et al.* 2000; Getha & Vikineswary 2002; Xiao *et al.* 2002; Joo 2005; Siddiqui 2006; Errakhi *et al.* 2007).

Uji penghambatan *Foc* oleh bakteri biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW secara *in-vitro* pada media PDA menunjukkan bahwa kedua bakteri ini memiliki aktivitas antifungal karena mampu menghambat pertumbuhan patogen *Foc*. Hasil penelitian secara *in-vitro* tersebut berkorelasi dengan percobaan aplikasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW secara *in-vivo* pada tanaman pisang. Aplikasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal maupun kombinasinya mampu menurunkan infeksi *Foc* dan populasinya di area rizosfer tanaman pisang Cavendish. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa tingkat infeksi dan populasi *Foc* pada tanaman pisang yang diberi agen biokontrol lebih rendah dan berbeda signifikan dengan perlakuan kontrol. Aplikasi bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai agen biokontrol pada tanaman pisang Cavendish pada percobaan *in-vivo* bersifat mencegah terjadinya peningkatan infeksi *Foc* pada tanaman. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsep aplikasi biokontrol lebih kepada pengendalian penyebaran infeksi bukan menghilangkan seluruh patogen.

Aktivitas antagonisme dari bakteri biokontrol terhadap patogen dilakukan melalui beberapa mekanisme antara lain: 1). kompetisi nutrisi, oksigen, dan habitat; 2). parasitisme, dengan menghasilkan enzim hidrolase seperti kitinase, protease dan β -1-3 glucanase yang berperan dalam melisiskan dinding sel jamur patogen; 3). sekresi senyawa antibiotik atau senyawa antifungal dan metabolit sekunder lainnya yang dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen (Benyagoub *et al.* 1998; Gomes *et al.* 2000; Getha & Vikineswary 2002; Woo *et al.* 2002; de Azaredo *et al.* 2004; Compant *et al.* 2005; Monteiro *et al.* 2005; Nourozian *et al.* 2006; Prapagdee *et al.* 2008; Rodas-Junco *et al.* 2009).

Aktivitas penghambatan *Foc* yang dilakukan oleh bakteri biokontrol dalam penelitian ini, secara *in-vitro* dan *in-vivo* menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan yang lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B maupun kombinasinya. Hal tersebut terjadi karena *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mampu mensintesis enzim hidrolase yang lebih lengkap dan berperan dalam penghambatan pertumbuhan *Foc* melalui dengan mendegradasi dinding sel kapang patogen. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW mampu mensintesis enzim protease dan kitinase, sedangkan *Bacillus* sp. 140-B hanya mensintesis protease. Keberadaan kitinase berperan aktif dalam melisiskan kitin yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel jamur melalui proses kitinolitik, sedangkan protease dapat melisiskan sel kapang patogen dan merusak miseliana melalui proses proteolitik (Gupta *et al.* 1995; Gomes *et al.* 2000; Basha & Ulaganathan 2002; Huang *et al.* 2005; Huang & Chen 2008; Nandakumar *et al.* 2007).

Potensi antagonisme *Streptomyces* sp. L.3.1-DW yang lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B juga dapat dikaitkan dengan beberapa kemampuan lainnya. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW menghasilkan senyawa antibiotik yang lebih banyak dan lebih baik dalam menghambat patogen *Foc* dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B, tetapi dalam penelitian ini belum dilakukan kajian lebih detail. Pada kondisi lingkungan di alam yang kompetitif, *Streptomyces* sp. memiliki kemampuan khusus untuk bertahan hidup dengan sekresi antibiotik dan membentuk hifa yang sangat baik di tanah dan area rizosfer yang berperan penting absorpsi nutrisi dan melindungi perakaran tanaman

terhadap infeksi *Foc* (Miyadoh 1993; Tanaka & Omura 1993; Reponen *et al.* 1998; Suzuki 2000; Benizri *et al.* 2001; Berdy 2005; de Vasconcellos & Cardoso 2009; Khamna *et al.* 2009). Berdasarkan hasil penelitian ini, *Streptomyces* sp. L.3.1-DW juga menghasilkan hormon tumbuh IAA dengan kadar yang lebih tinggi daripada *Bacillus* sp. 140-B, sehingga mampu meningkatkan ketahanan tanaman pisang terhadap patogen dengan lebih baik. Produksi hormon tumbuh IAA berperan dalam memacu peningkatan *induced systemic resistance* (ISR) untuk meningkatkan sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Shiddique 2006).

Aplikasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW pada tanaman pisang juga memberikan dampak terhadap sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen *Foc*. Infeksi *Foc* akan memicu tanaman pisang untuk meningkatkan mekanisme pertahanannya dengan menghasilkan enzim PAL dan TAL yang merupakan salah satu respon awal dari tanaman pisang terhadap infeksi patogen *Foc* (Ebel 1986; Khan *et al.* 2003). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman kontrol cenderung menghasilkan enzim PAL dan TAL lebih tinggi tetapi tidak signifikan dibandingkan dengan tanaman yang diberi perlakuan biokontrol. Pada perlakuan pemberian biokontrol, diketahui bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan menghasilkan enzim PAL dan TAL lebih tinggi dibandingkan perlakuan biokontrol lainnya. Aktivitas enzim PAL dan TAL pada tanaman pisang dalam penelitian ini dapat juga dipengaruhi oleh periode pengukurannya. Dalam penelitian ini, pengukuran aktivitas PAL dan TAL hanya dilakukan pada akhir waktu penelitian sehingga tidak dapat mencerminkan keseluruhan aktivitasnya. Pengukuran aktivitas PAL dan TAL dapat dilakukan secara periodik sejak terjadi gejala infeksi untuk mengetahui laju peningkatan aktivitasnya.

Aplikasi *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW pada tanaman pisang juga memberikan dampak terhadap pertumbuhan tanaman pisang, baik yang tanaman yang tidak diinfeksi maupun yang diinfeksi *Foc*. Tanaman pisang tanpa infeksi *Foc* yang diberi agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki rata-rata tinggi yang berbeda signifikan dengan tanaman kontrol setelah perlakuan pada hari ke-14 dan 30. Pada tanaman pisang

yang diinfeksi *Foc* dan diberi agen biokontrol, *Streptomyces* L.3.1-DW memiliki rata-rata tinggi yang berbeda signifikan dengan tanaman kontrol setelah perlakuan pada hari ke-30, sedangkan perlakuan dengan *Bacillus* sp. 140-B dan kombinasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kontrol. *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan meningkatkan pertumbuhan tanaman lebih baik dibandingkan perlakuan biokontrol lainnya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berpotensi sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan infeksi *Foc* sekaligus meningkatkan pertumbuhan tanaman pisang. Oleh karena itu *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dapat dikatakan berperan sebagai agen *plant growth-promoting bacteria* (PGPR) (Glick *et al.* 2001; Tokala *et al.* 2002; Merzaeva & Shirokikh 2006; Akgul & Mirik 2008). PGPR memberikan dampak pada pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan siklus nutrisi, menekan patogen dan menghasilkan senyawa biologi aktif (Khalid *et al.* 2004). Dampak PGPR sangat menguntungkan bagi tanaman dalam melawan patogen, karena menghasilkan senyawa antifungal yang dapat meningkatkan resistensi tanaman terhadap infeksi patogen meskipun dalam kondisi lingkungan yang kurang nutrisi (Sid Ahmed *et al.* 2000; Ramamoorthy *et al.* 2001; Dey *et al.* 2004; Compant *et al.* 2005; Herman *et al.* 2008; Minorsky *et al.* 2008).

Kolonisasi *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR) di perakaran tanaman dapat terjadi melalui produksi hormon tumbuh IAA. Dalam penelitian ini, kedua bakteri agen biokontrol mampu menghasilkan IAA, di mana perlakuan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW menghasilkan hormon tumbuh IAA dengan kadar yang lebih tinggi daripada *Bacillus* sp. 140-B. IAA yang dihasilkan oleh PGPR berfungsi sebagai sinyal molekuler yang penting dalam regulasi perkembangan tanaman, memacu perkembangan perakaran tanaman inang, meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen dan memacu pertumbuhan tanaman (Cattelan *et al.* 1999; Shaharoon *et al.* 2006; Egamberdiyeva 2007; Ashrafuzzaman *et al.* 2009; Jossi & Bath 2011). Produksi hormon IAA juga berkaitan dengan aktivitas enzim resistensi PAL dan TAL. Beaudoin-Eagen dan Thorpe (1985) juga menyebutkan adanya keseimbangan antara produksi senyawa

fenol dengan hormon tumbuh IAA. Semakin besar produksi hormon tumbuh IAA, maka senyawa fenol yang dihasilkan juga semakin besar.

Berdasarkan uji secara *in-vitro* dan *in-vivo*, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki keunggulan dibandingkan dengan bakteri lain yang digunakan sebagai agen biokontrol dalam beberapa penelitian sebelumnya. Keunggulan tersebut antara lain dilihat dari kemampuan dalam menghasilkan enzim PAL dan TAL serta hormon tumbuh IAA yang berperan dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen dan memacu peningkatan pertumbuhan tanaman. Oleh karena itu, selain berpotensi sebagai agen biokontrol, *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW juga berpotensi sebagai agen PGPR. Dengan demikian, bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW diduga dapat dijadikan sebagai salah satu upaya pengendalian infeksi patogen *Foc* pada tanaman pisang Cavendish melalui pemanfaatan agen biokontrol.

RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

1. *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW berpotensi untuk menghambat pertumbuhan kapang patogen *Foc*, melalui sintesis enzim protease dan kitinase serta produksi hormon tumbuh IAA.
2. Aplikasi agen biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW serta kombinasinya mampu menekan infeksi *Foc* pada tanaman pisang, menurunkan populasi *Foc* di area rizosfer tanaman, menghasilkan aktivitas enzim ketahanan PAL dan TAL, serta meningkatkan pertumbuhan tanaman yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman kontrol.
3. Pada percobaan *in-vitro*, *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki aktivitas antagonisme yang cenderung lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B. Hal tersebut ditunjukkan dengan persentase penghambatan yang lebih besar, sintesis enzim hidrolase yang lebih kompleks (protease dan kitinase), serta kadar IAA yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B.
4. Aplikasi biokontrol secara *in-vivo*, menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. L.3.1-DW memiliki kecenderungan sebagai agen biokontrol yang lebih baik dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B maupun kombinasinya. Hal tersebut ditunjukkan dengan kemampuan menekan infeksi *Foc*, menurunkan populasi *Foc* di area rizosfer tanaman, aktivitas PAL dan TAL serta pertumbuhan tanaman yang lebih baik dibandingkan perlakuan *Bacillus* sp. 140-B maupun kombinasinya
5. Aplikasi bakteri biokontrol *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW sebagai isolat tunggal memberikan dampak yang lebih baik pada tanaman pisang dibandingkan dengan kombinasinya.

SARAN

1. Pada pengukuran enzim kitinase, perlu dilakukan pengukuran aktivitas endokitinase, sehingga dapat diperoleh aktivitas kitinase yang lebih akurat dari bakteri *Streptomyces* sp. L.3.1-DW.

2. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang senyawa antifungal yang dihasilkan oleh bakteri biokontrol yang berperan dalam menghambat pertumbuhan kapang patogen *Foc*.
3. Untuk mengetahui dampak pemberian bakteri biokontrol terhadap tanaman yang diinfeksi patogen *Foc*, perlakuan aplikasi biokontrol dapat dilakukan dengan meningkatkan kepadatan sel bakteri agen biokontrol supaya diperoleh hasil yang signifikan.
4. Pengukuran aktivitas enzim PAL dan TAL perlu dilakukan secara periodik, sehingga dapat mencerminkan sistem ketahanan tanaman pisang yang terinfeksi patogen *Foc*.
5. Berdasarkan hasil dari penelitian ini, maka dapat disarankan pada penelitian selanjutnya untuk mengkaji potensi *Streptomyces* sp. L.3.1-DW lebih detail, karena bakteri tersebut memiliki kemampuan yang lebih baik sebagai agen biokontrol dibandingkan *Bacillus* sp. 140-B.

DAFTAR ACUAN

- Abd-Allah, E.F., S.M. Ezzat & M.R. Tohamy. 2007. *Bacillus subtilis* as an alternative biologically based strategy for controlling *Fusarium* wilt disease in tomato: A histological study. *Phytopathology*, **35**(5): 474--478.
- Ahmad, F., I. Ahmad & M.S. Khan. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research*, **36**: 1--9.
- Akgul, D.S. & M. Mirik. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology*, **90**(1): 29--34.
- Akhtar, M.S., U. Shakeel & Z.A. Siddiqui. 2008. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkey Journal Biology*, **34**: 1--7.
- Anitha, A. & M. Rabeeth. 2009. Control of *Fusarium* wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. *African Journal of Basic and Applied Sciences*, **1**(1-2): 9--14.
- Antonius, S., N. Laili, Yanti, A. Nurkanto & D. Agustiyani. 2009. Eksplorasi dan penapisan mikroba dari Malinau sebagai agen hayati pendukung pertanian yang berkelanjutan. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki Malang 24-25 Juli 2009*. 347--357.
- Asaka, O. & M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(11): 4081--4085.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, M.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah & S. Meon. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, **8**(7): 1247--1252.
- Basha, S. & K. Ulaganathan. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science*, **82**(12): 1457--1463.

- Bastasa, G.N. & A.A. Balliad. 2005. Biological control of Fusarium wilt of abaca (*Fusarium oxysporum*) with *Trichoderma* and yeast. *Philippines Journal Corps Science*, **30**: 29--37.
- Beaudoin-Eagan, L.D. & T.A. Thorpe. 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, **78**: 438--441.
- Benhamou, N., J.W. Kloepper, A. Qualdt-Hallman & S. Tuzun. 1996. Induction of defence-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, **112**: 919--926.
- Benitez, J.A., A.J. Silva & R.A. Finkelstein. 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. *American Society for Microbiology*, **69**(10): 6549--6553.
- Benizri, E., E. Baudoin & A. Guckert. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science Technology*, **11**: 557--574.
- Benyagoub, M., N. Benhamou & O. Carisse. 1998. Cytochemical investigation of the antagonistic interaction between a *Microsphaeropsis* sp. (isolate P130A) and *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **88**: 605--613.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal Antibiotic*, **58**:1--26.
- Bharathi, R., R. Vivekananthan, S. Harish, A. Ramanathan & R. Samiyappan. 2004. Rhizobacteria-based bio-formulation for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, **23**: 835--843.
- Cattelan, A.J., P.G. Hartel & J.J Fuhrmann. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society for America*, **63**: 1670--1680.
- Chakraborty, U. & N. Chakraborty. 2005. Impact of environmental factors on infestation of tea leaves by *Helopeltis theivora* and associated changes in flavonoid flavor components and enzyme activities. *Phytoparasitica*, **33**: 88--96.
- Christopher, D.J., T.S. Raj, S.U. Rani & R. Udhayakumar. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against

- Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Biopesticides*, **3**: 158--162.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement & E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospect. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(9): 4951--4959.
- Daly, A., G. Walduck & Darwin. 2006. *Fusarium* wilt of bananas (Panama disease). *Northern Territory Government*, **151**: 1--5.
- de Azeredo, L.A.I., D.M.G. Freire, R.M.A. Soares, S.G.F. Leite & R.R.R. Coelho. 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbiology Technology*, **34**: 354--358.
- de Vasconcellos, R.L.F. & E.J.B.N. Cardoso. 2009. Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol*, **54**: 807--816.
- Dey, R., K.K. Pal, D.M. Bath & S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology Research*, **159**: 371--394.
- Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Souza & G.H.J. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology*, **10**: 1--10.
- Di Pietro, A., M.P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana & M.I.G. Roncero. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 315--325.
- Dixon, R.A. & N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**: 1085--1097.
- do Nascimento, W.C.A. & M.L.L. martins. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**: 91--96.
- Earl, A.M., R. Losick & R. Kolter. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, **16**(6): 269--275.

- Ebel, J. 1986. Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annual Review Phytopathology*, **24**: 235--264.
- Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, **36**: 184--189.
- El-Tharabily, K.A., M.H. Soliman, A.H. Nassar, H.A. Al-Hassani, K. Sivasithamparam, F. Mckenna & G.E. St. J. Hardy. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*, **49**: 573--583.
- Errakhi, R., F. Bouteau, A. Lebrihi & M. Barakatee. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **23**: 1503--1509.
- Fguira, L.F., S. Fotso, R.B. Amer-Mehdi, L. Mellouli & H. Laatsch. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*, **156**: 341--347.
- Getha, K. & S. Vikineswary. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**: 303--310.
- Glick, B.R., D.M. Penrose & W. Ma. 2001. Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advanced*, **19**: 135--138.
- Gnanamangai, B.M., P. Ponmurugan, R. Yazhini & S.K. Pragadeesh. 2011. PR enzyme activities of *Cercospora theae* causing bird's eye spot disease in tea plants (*Camelia canensis* (L.) O.kuntze). *Plant Pathology Journal*, **10**(1): 13--21.
- Gomes, R.C., L.T.A.S. Semedo, R.M.A. Soares, C.S. Alviano, L.F. Linhares & R.R.R. Coelho. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letter Applied Microbiology*, **30**: 146--150.

- Gupta, R., R.K. Saxena, P. Chaturvedi & J.S. Viridi. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: Its potential in fungal cell wall lysis. *Journal Applied Bacteriology*, **78**: 378--383.
- Herman, M.A.B., B.A. Nault & C.D. Smart. 2008. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection*, **27**: 996--1002.
- Hervas, A., B. Linda & R.M. Jimenez-Diaz. 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from Fusarium wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal Plant Pathology*, **103**: 631--642.
- Huang, C.J. & C.Y. Chen. 2008. Synergistic interactions between chitinase ChicCW and fungicides against plant fungal pathogen. *Journal Microbiology Biotechnology*, **18**(4): 784--787.
- Huang, C.J., T.K. Wang, S.C. Chung & C.Y. Chen. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-29. *Journal Biochemistry Molecular Biology*, **38**(1): 82--88.
- Hwang, S.C. & W.H. Ko. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*, **88**: 580--588.
- Ishii, H. 2004. Studies on fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Journal Genetic Plant Pathology*, **7**: 379--386.
- Jeun. Y.C., K.S. Park, C.H. Kim, W.D. Fowler & J.W. Kloepper. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, **29**: 34--42.
- Joo, G.J. 2005. Production of an antifungal substance of biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letter*, **27**: 201--205.
- Joshi, P. & A.B. Bath. 2011. Diversity and function of plant growth-promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalaya Region. *International Journal of Environmental Sciences*, **1**(6): 1135--1143.

- Jumjunidang, Riska & A. Soemargono. 2012. Identification and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates through analysis of vegetative compatibility group in Lampung Province, Indonesia. *ARNP Journal of Agriculture and Biological Science*, **7**(4): 279--284.
- Khalid, A., M. Arshad & Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, **96**: 473--480.
- Khamna, S., A. Yokota, J.F. Peberdy & S. Lumyong. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from rizhosphere Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology*, **6**(3): 143--147.
- Khan, W., B. Prit hiviraj & D.L. Smith. 2003. Chitosan and Chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal Plant Physiology*, **160**: 859--863.
- Kim, H.S., J. Park, S.W. Choi, K.H. Choi, G.P. Lee, S.J. Ban, C.H. Lee & C.S. Kim. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology*, **41**(3): 196--201.
- Kumar, H.B., A.C.U. Shankar, S.C. Nayaka, K.R. Kini, H.S. Shetty & H.S. Prakash. 2010. Biochemical characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from India. *African Journal of Biotechnology*, **9**(4): 523--530.
- Kumari, B.S., M.R. Ram & K.V. Mallaiiah. 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. *Journal of Microbiology Research*, **3**(1): 10--14.
- Laili, N. & S. Antonius. 2009. Potensi aktinomisetes indigenous Malinau sebagai agen biokontrol untuk mendukung pertanian yang berwawasan lingkungan di Malinau Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional Biologi 7 ITS Surabaya 07 Nopember 2009*. 219--227.
- Leong, S.K., Z. Latiffah & S. Baharuddin. 2009. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. *American Journal of Applied Sciences*, **6**(7): 1301--1307.
- Lugtenberg, B.J.J. & L.C. Dekkers. 1999. What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environmental Microbiology*, **1**: 9--13.

- Madigan, M.T. & J.M. Martinko. 2011. *Brock Biology of Microorganism*. Pearson Prentice Hall, USA: xxv + 992 hlm.
- Mak, C., A.A. Mohamed, K.W. Liew & Y.W. Ho. 2004. Early screening tehcnique for *Fusarium* wilt resistance in banana micropropagated plants. Banana improvement. *FAO Corporate Document Respiratory*.
- Mayanti, B. & H.D. Ariesyady. 2009. Identifikasi keberagaman bakteri pada *commercial-seed* pengolah limbah cair cat. Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Institut Teknologi Bandung. 1--11.
- Merzaeva, O.V. & I.G. Shirokikh. 2006. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. *Microbiology*, **75**: 226--230.
- Minorsky, P.V. 2008. On the side. *Plant Physiology*, **146**: 323--324.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*, **7**: 100--106.
- Molina, A.B., R.C. Williams, C. Hermanto, Suwanda, B. Komolong & P. Kokoa. 2010. Mitigating the threat of banana *Fusarium* wilt: understanding the agroecological distribution of pathogenic forms and developing disease management strategies. *Australian Center for International Agriculture Research*, Final Report: 1--76.
- Monte, E. & A. Llobell. 2003. *Trichoderma* in organic agriculture. *Proceedings V World Avocado Congress 2003*, 725--733.
- Monteiro, L., R.dL.R. Mariano & A.M. Santo-Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. againts *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technolgy*, **48**(1): 23--29.
- Mrkovacki, N. & V. Milic. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agriculture application. *Annual Microbiology*, **51**: 145--158.
- Nandakumar, R., S. Babu, T. Raguchander & R. Samiyappan. 2007. Chitinolytic activity of native *Pseudomonas flourescens* strains. *Journal of Agriculture Sciences*, **9**: 61--68.
- Nasir, N. & Jumjunidang. 2002. Strategi jangka pendek menahan laju perluasan serangan penyakit layu pisang. Seminar Nasional Pengendalian Penyakit

- Layu Pisang: Mencegah kepunahan, mendukung ketahanan pangan dan agribisnis, 22-23 Oktober 2009.
- Nasir, N. & Jumjunidang. 2003. Karakterisasi ras *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dengan metode *vegetative compatibility group test* dan identifikasi kultivar pisang yang terserang. *Jurnal Hortikultura*, **13**: 276--284.
- Nasir, N., P.A. Pittaway & K.G. Pegg. 2003. Effect of organic amendments and solarisation on *Fusarium* wilt in susceptible banana plantlets, transplanted into naturally infested soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, **54**: 251--257.
- Nicholson, R.L. & R. Hammerschmidt. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review Phytopathology*, **30**: 369--389.
- Nourozian, J., H.R. Etebarian & G. Khodakaramian. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin Journal Science Technology*, **28**(1): 29--38.
- Ona, O., I. Smets, P. Gysegom, K. Bernaerts, J. van Impe, E. Prinsen & J. Vanderleyden. 2003. The effect of pH on indole-3-acetic-acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp7. *Symbiosis*, **35**:199--208.
- Ona, O., J. van Impe, E. Prinsen & J. Vanderleyden. 2005. Growth and indole-3-acetic-acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letter*, **246**: 125--132.
- Ouchdouch, Y., M. Barakate & C. Finance. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Journal Soil Biology*, **37**: 69--74.
- Patten, C. & B.R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**: 207--220.
- Perez-Vicente, L. 2004. *Fusarium* wilt (Panama disease) of bananas: An updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. *XVI Reunion Internacional Acorbat*. Playa, Cuba: 1--15.
- Ploetz, R.C. 2000. Panama disease: A classic and destructive disease of banana. Online: *Plant Health Progress*, 10.1094/PHP-2000-1204-01-HM.

- Ploetz, R.C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *The American Phytopathological Society*, **96**(6): 653--656.
- Prapagdee, B., C. Kuekulvong & S. Mongkolsuk. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, **4**(5): 330--337.
- Quecine, M.C., W.L. Araujo, J. Marcon, C.S. Gai, J.L. Azevedo & A.A. Pizzirani-Kleiner. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, **47**: 486--491.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasan & R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and disease. *Crop Protection*, **20**: 1--11.
- Reglinski, T., G. Whitaker, J.M. Cooney, J.T. Taylor, P.R. Poole, P.B. Roberts & K.K. Kim. 2001. Systemic acquired resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwi fruit vines. *Physiological Molecular Plant Pathology*, **58**: 111--118.
- Reponen, T.A., S.V. Gazonko, A.S. Grinshpun, K. Willeke & E.C. Cole. 1998. Characteristic of airborne actinomycetes spores. *Applied Environmental Microbiology*, **64**: 3807--3812.
- Rifaat, H.M., S.M. Hassanein, O.H. El-Said, S.A. Saleh & M.S.M. Selim. 2005. Purification and characterisation of extracellular neutral protease from *Streptomyces microflavus*. *Arabian Journal of Biotechnology*, **9**(1): 51--60.
- Rodas-Junco, B.A., H.F. Magana-Sevilla, J.M. Tun-Suarez & A. Reyes-Ramirez. 2009. Antifungal activity in vitro of native *Bacillus* sp. strains against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Research Journal of Biological Sciences*, **4**(9): 985--989.
- Sadowsky, M.J., H.H. Keyser & B.B. Bohlool. 1983. Biochemical characterization of fast and slow growing rhizobia that nodulate soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**(4): 716--722.

- Salantur, A., A. Ozturk & S. Akten. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environment*, **52**(3): 111--118.
- Salerno, M.I., S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson. 2000. Effects on growth and comparison of root tissue colonization pattern of *Eucalyptus viminalis* and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **146**: 317--324.
- Saravanan, T., M. Muthusamy & T. Marimuthu. 2004a. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on *Fusarium* wilt pathogen in banana rhizosphere. *Journal of Biological Sciences*, **4**(2): 192--198.
- Saravanan, T., R. Bhaskaran & M. Muthusamy. 2004b. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt disease. *Plant Pathology Journal*, **3**(2): 72--80.
- Saravanan, T. & M. Muthusamy. 2006. Influence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder and Hansen on 2,4-diacetylphloroglucinol production by *Pseudomonas fluorescens* migula in banana rhizosphere. *Journal of Plant Protection Research*, **46**(3): 241--254.
- Sejiny, M.J. 1991. Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. *Journal King Abdul Azis University: Science*, **3**: 21--29.
- Shaharoon, B., M. Arshad, Z.A. Zahir & A. Khalid. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-diaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**: 2971--2975.
- Shanmugaiah, V., N. Mathivanan, N. Balasubramanian & P.T. Manoharan. 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*, **7**(15): 2562--2568.
- Sid Ahmed, A., C. Perez & M.E. Candela. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsici annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 817--824.

- Siddiqui, Z.A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui, Z.A (ed.). 2006. *Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Amsterdam, 111-142.
- Sinha, A. & P.S. Basu. 1981. Indole-3-acetic acid and its metabolism in root nodule of *Pongamia pinnata* (L) Pierre. *Biochemical Physiology Pflanzen*, **176**(3): 218--227.
- Smith, I.M., S.A. Archer, J. Dunez, R.A. Lelliot & D.H. Phillips. 1988. *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 583 hlm.
- Suzuki, S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetologica*, **14**(2): 27--33.
- Taechowisan, T., C. Lu, Y. Shen & S. Lumyong. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*, **151**: 1691--1695.
- Tanaka Y.T. & S. Omura. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annual Revised Microbiology*, **47**: 57--87.
- Tawfik, K.A. & E.M. Ramadan. 1991. Factors affecting the biological activity of *Streptomyces aureofaciens* MY18 and *S. roseviolaceus* MR13. *Journal King Abdul Azis University: Science*, **3**: 5--19.
- Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey & M.J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2161--2171.
- van de Broek, A., P. Gysegom, O. Ona, N. Hendrickx, E. Prinsen, J. van Impe & J. Vanderleyden. 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **18**: 311--323.
- Verma, S.C., J.K. Ladha & A.K. Tripathi. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, **91**: 127--141.

- Widono, S., C. Sumardiyanto & B. Hadisutrisno. 2003. Pengimbasan ketahanan pisang terhadap penyakit layu *Fusarium* dengan *Burkholderia cepacia*. *Agrosains*, **5**(2): 72--79.
- Woo, S., V. Fogliano, F. Scala & M. Lorito. 2002. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 353--356.
- Xiao, K., L.L. Kinkel & D.A. Samac. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, **23**: 285--295.

Lampiran 1. Isolat bakteri *Bacillus* sp. 140-B dan *Streptomyces* sp. L.3.1-DW dalam media cair

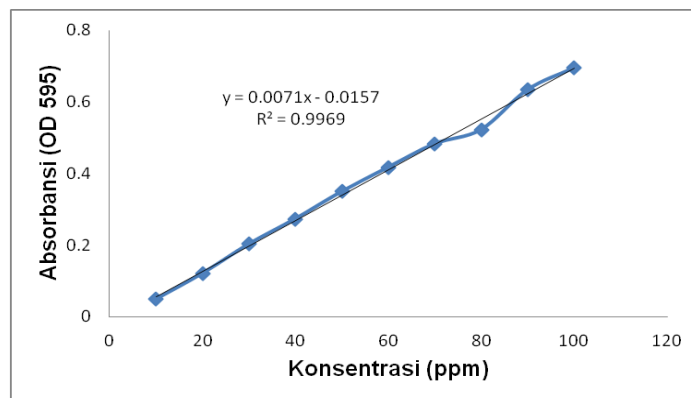


Streptomyces sp. L.3.1-DW

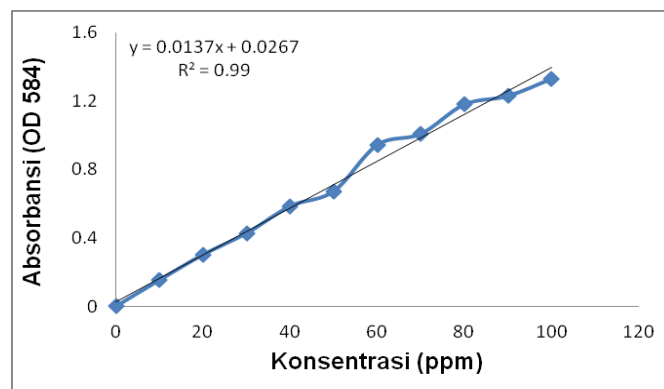


Bacillus sp. 140-B

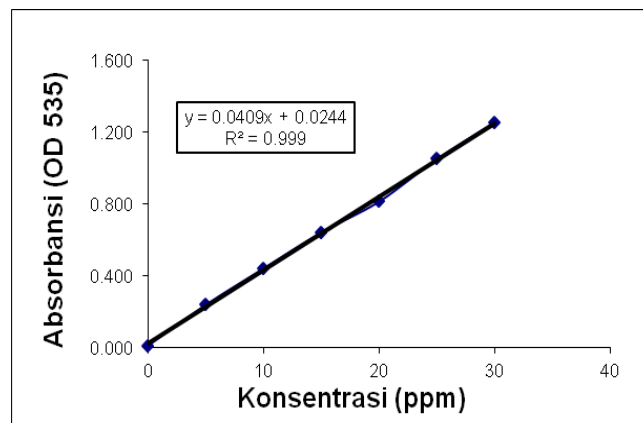
Lampiran 2. Kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) untuk pengukuran kadar protein



Lampiran 3. Kurva standar N-Acetyl Glucosamin (NAG) untuk pengukuran aktivitas kitinase



Lampiran 4. Kurva standar IAA

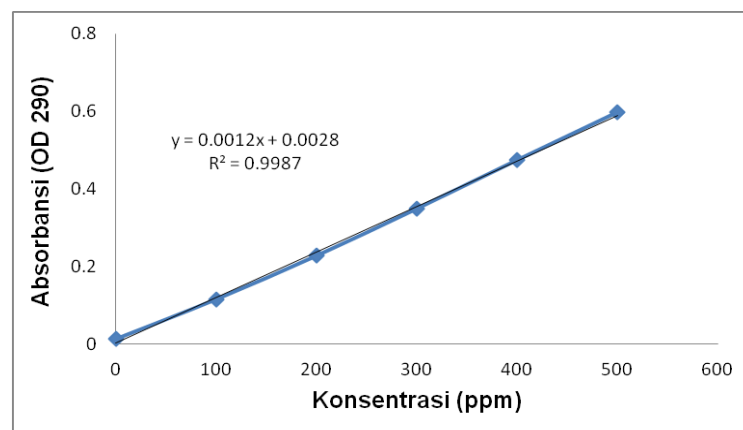


Lampiran 5. Perendaman bibit tanaman pisang dengan larutan biokontrol

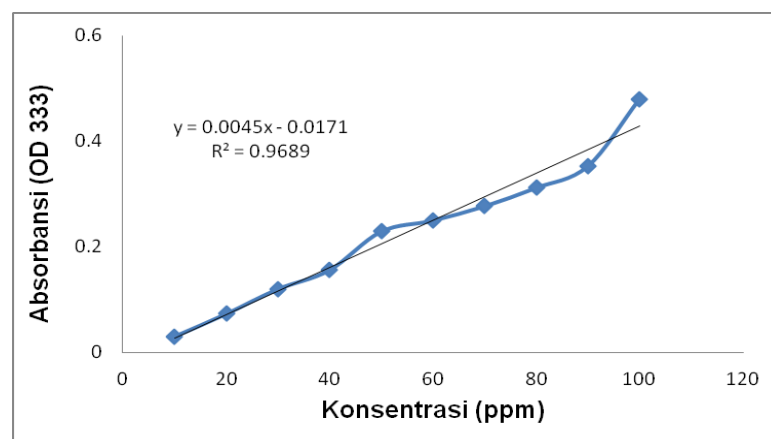
Lampiran 6. Morfologi tanaman tanpa inokulasi *Foc* pada media pasir

Lampiran 7. Morfologi tanaman yang diinokulasi *Foc* pada media pasir

Lampiran 8. Kurva standar Trans-Cinamic Acid untuk pengukuran aktivitas PAL



Lampiran 9. Kurva standar P-Coumaric Acid untuk pengukuran aktivitas TAL



Lampiran 10. Hasil uji ANOVA satu arah pada persentase infeksi *Foc* pada tanaman pisang Cavendish di rumah kaca

Descriptives								
Infeksi_Foc					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
K (-)	4	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
K (+)	4	81.6675	21.34297	10.67148	47.7061	115.6289	60.00	100.00
140-B	4	22.5000	7.38868	3.69434	10.7430	34.2570	16.67	33.33
L.3.1	4	20.0000	.00000	.00000	20.0000	20.0000	20.00	20.00
140-B + L.3.1	4	31.7250	6.48669	3.24334	21.4032	42.0468	25.00	40.00
Total	20	31.1785	29.50809	6.59821	17.3683	44.9887	.00	100.00

ANOVA					
Infeksi_Foc					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14887.247	4	3721.812	33.700	.000
Within Groups	1656.576	15	110.438		
Total	16543.823	19			

Lampiran 11. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada persentase infeksi *Foc* pada tanaman pisang Cavendish di rumah kaca

Infeksi_Foc					
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Tukey HSD ^a K (-)	4	.0000			
L.3.1	4	20.0000	20.0000		
140-B	4	22.5000	22.5000		
140-B + L.3.1	4		31.7250		
K (+)	4			81.6675	
Sig.		.056	.532	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Infeksi_Foc

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan				Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	K (-)	K (+)	81.66750*	7.43096	.000	-104.6137	-58.7213
		140-B	-22.50000	7.43096	.056	-45.4462	.4462
		L.3.1	-20.00000	7.43096	.103	-42.9462	2.9462
		140-B + L.3.1	31.72500*	7.43096	.005	-54.6712	-8.7788
	K (+)	K (-)	81.66750*	7.43096	.000	58.7213	104.6137
		140-B	59.16750*	7.43096	.000	36.2213	82.1137
		L.3.1	61.66750*	7.43096	.000	38.7213	84.6137
		140-B + L.3.1	49.94250*	7.43096	.000	26.9963	72.8887
	140-B	K (-)	22.50000	7.43096	.056	-.4462	45.4462
		K (+)	59.16750*	7.43096	.000	-82.1137	-36.2213
		L.3.1	2.50000	7.43096	.997	-20.4462	25.4462
		140-B + L.3.1	-9.22500	7.43096	.729	-32.1712	13.7212
	L.3.1	K (-)	20.00000	7.43096	.103	-2.9462	42.9462
		K (+)	61.66750*	7.43096	.000	-84.6137	-38.7213
		140-B	-2.50000	7.43096	.997	-25.4462	20.4462
		140-B + L.3.1	-11.72500	7.43096	.532	-34.6712	11.2212
	140-B + L.3.1	K (-)	31.72500*	7.43096	.005	8.7788	54.6712
		K (+)	49.94250*	7.43096	.000	-72.8887	-26.9963
		140-B	9.22500	7.43096	.729	-13.7212	32.1712
		L.3.1	11.72500	7.43096	.532	-11.2212	34.6712

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 12. Hasil uji ANOVA satu arah pada populasi *Foc* di area rizosfer tanaman pisang Cavendish di rumah kaca

Descriptives

populasi_FOC

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (+)	2	2.8750E6	5.30330E5	3.75000E5	-1.8898E6	7.6398E6	2.50E6	3.25E6
140-B	2	1.0000E6	3.53553E5	2.50000E5	-2.1766E6	4.1766E6	7.50E5	1.25E6
L.3.1	2	8.7500E5	1.76777E5	1.25000E5	-713275.5920	2.4633E6	7.50E5	1.00E6
140-B + L.3.1	2	1.0000E6	7.07107E5	5.00000E5	-5.3531E6	7.3531E6	5.00E5	1.50E6
Total	8	1.4375E6	9.61305E5	3.39873E5	633828.9776	2.2412E6	5.00E5	3.25E6

ANOVA

populasi_FOC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.531E12	3	1.844E12	7.867	.037
Within Groups	9.375E11	4	2.344E11		
Total	6.469E12	7			

Descriptives

populasi_FOC

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (+)	2	2.1250E6	1.76777E5	1.25000E5	536724.4080	3.7133E6	2.00E6	2.25E6
140-B	2	7.5000E5	.00000	.00000	750000.0000	750000.0000	7.50E5	7.50E5
L.3.1	2	6.2500E5	1.76777E5	1.25000E5	-963275.5920	2.2133E6	5.00E5	7.50E5
140-B + L.3.1	2	8.7500E5	1.76777E5	1.25000E5	-713275.5920	2.4633E6	7.50E5	1.00E6
Total	8	1.0938E6	6.53801E5	2.31153E5	547158.9351	1.6403E6	5.00E5	2.25E6

ANOVA

populasi_FOC					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.898E12	3	9.661E11	41.222	.002
Within Groups	9.375E10	4	2.344E10		
Total	2.992E12	7			

Lampiran 13. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada populasi *Foc* di area rizosfer tanaman pisang Cavendish di rumah kaca

Multiple Comparisons

Dependent Variable: populasi_FOC

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Kontrol (+)	140-B	1.87500E6	4.84123E5	.059	-95794.8977	3.8458E6
		L.3.1	2.00000E6*	4.84123E5	.048	29205.1023	3.9708E6
		140-B + L.3.1	1.87500E6	4.84123E5	.059	-95794.8977	3.8458E6
	140-B	Kontrol (+)	-1.87500E6	4.84123E5	.059	-3.8458E6	95794.8977
		L.3.1	1.25000E5	4.84123E5	.993	-1.8458E6	2.0958E6
		140-B + L.3.1	.00000	4.84123E5	1.000	-1.9708E6	1.9708E6
	L.3.1	Kontrol (+)	-2.00000E6*	4.84123E5	.048	-3.9708E6	-29205.1023
		140-B	-1.25000E5	4.84123E5	.993	-2.0958E6	1.8458E6
		140-B + L.3.1	-1.25000E5	4.84123E5	.993	-2.0958E6	1.8458E6
	140-B + L.3.1	Kontrol (+)	-1.87500E6	4.84123E5	.059	-3.8458E6	95794.8977
		140-B	.00000	4.84123E5	1.000	-1.9708E6	1.9708E6
		L.3.1	1.25000E5	4.84123E5	.993	-1.8458E6	2.0958E6

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

populasi_FOC

		N	Subset for alpha = 0.05	
Perlakuan			1	2
Tukey HSD ^a	L.3.1	2	8.7500E5	
	140-B	2	1.0000E6	1.0000E6
	140-B + L.3.1	2	1.0000E6	1.0000E6
	Kontrol (+)	2		2.8750E6
	Sig.			.993

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

Multiple Comparisons

Dependent Variable:populasi_FOC

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Kontrol (+)	140-B	1.37500E6*	1.53093E5	.003	751779.9322	1.9982E6
		L.3.1	1.50000E6*	1.53093E5	.002	876779.9322	2.1232E6
		140-B + L.3.1	1.25000E6*	1.53093E5	.004	626779.9322	1.8732E6
	140-B	Kontrol (+)	-1.37500E6*	1.53093E5	.003	-1.9982E6	-7.5178E5
		L.3.1	1.25000E5	1.53093E5	.845	-4.9822E5	748220.0678
		140-B + L.3.1	-1.25000E5	1.53093E5	.845	-7.4822E5	498220.0678
	L.3.1	Kontrol (+)	-1.50000E6*	1.53093E5	.002	-2.1232E6	-8.7678E5
		140-B	-1.25000E5	1.53093E5	.845	-7.4822E5	498220.0678
		140-B + L.3.1	-2.50000E5	1.53093E5	.455	-8.7322E5	373220.0678
	140-B + L.3.1	Kontrol (+)	-1.25000E6*	1.53093E5	.004	-1.8732E6	-6.2678E5
		140-B	1.25000E5	1.53093E5	.845	-4.9822E5	748220.0678
		L.3.1	2.50000E5	1.53093E5	.455	-3.7322E5	873220.0678

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

populasi_FOC

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a L.3.1	2	6.2500E5	
140-B	2	7.5000E5	
140-B + L.3.1	2	8.7500E5	
Kontrol (+)	2		2.1250E6
Sig.		.455	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

Lampiran 14. Hasil uji ANOVA satu arah pada aktivitas enzim PAL dan TAL tanaman pisang Cavendish di rumah kaca

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PAL K (+)	4	1.87043E2	65.910019	3.295501E1	82.16495	291.92005	123.920	278.500
140-B	4	1.45582E2	12.339901	6.169951	125.94696	165.21804	134.330	157.670
L.3.1	4	1.61415E2	33.916769	1.695838E1	107.44585	215.38415	135.580	209.330
140-B + L.3.1	4	1.27042E2	9.479706	4.739853	111.95817	142.12683	116.420	138.500
Total	16	1.55271E2	40.793313	1.019833E1	133.53340	177.00785	116.420	278.500
TAL K (+)	4	3.44650E1	10.178296	5.089148	18.26906	50.66094	25.240	48.800
140-B	4	2.57150E1	4.261881	2.130941	18.93340	32.49660	20.470	30.130
L.3.1	4	3.01625E1	7.612894	3.806447	18.04869	42.27631	21.580	40.020
140-B + L.3.1	4	2.56900E1	4.991219	2.495609	17.74786	33.63214	19.690	29.910
Total	16	2.90081E1	7.419560	1.854890	25.05452	32.96173	19.690	48.800

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PAL Between Groups	7751.569	3	2583.856	1.802	.200
Within Groups	17209.847	12	1434.154		
Total	24961.416	15			

TAL	Between Groups	211.859	3	70.620	1.380	.296
	Within Groups	613.889	12	51.157		
	Total	825.748	15			

Lampiran 15. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada aktivitas enzim PAL dan TAL tanaman pisang Cavendish di rumah kaca

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PAL Tukey HSD	K (+)	140-B	41.460000	2.677829E1	.441	-38.04210	120.96210
		L.3.1	25.627500	2.677829E1	.775	-53.87460	105.12960
		140-B + L.3.1	60.000000	2.677829E1	.167	-19.50210	139.50210
	140-B	K (+)	-41.460000	2.677829E1	.441	-120.96210	38.04210
		L.3.1	-15.832500	2.677829E1	.933	-95.33460	63.66960
		140-B + L.3.1	18.540000	2.677829E1	.898	-60.96210	98.04210
	L.3.1	K (+)	-25.627500	2.677829E1	.775	-105.12960	53.87460
		140-B	15.832500	2.677829E1	.933	-63.66960	95.33460
		140-B + L.3.1	34.372500	2.677829E1	.590	-45.12960	113.87460
	140-B + L.3.1	K (+)	-60.000000	2.677829E1	.167	-139.50210	19.50210
		140-B	-18.540000	2.677829E1	.898	-98.04210	60.96210
		L.3.1	-34.372500	2.677829E1	.590	-113.87460	45.12960
TAL Tukey HSD	K (+)	140-B	8.750000	5.057541	.351	-6.26534	23.76534
		L.3.1	4.302500	5.057541	.829	-10.71284	19.31784
		140-B + L.3.1	8.775000	5.057541	.349	-6.24034	23.79034
	140-B	K (+)	-8.750000	5.057541	.351	-23.76534	6.26534
		L.3.1	-4.447500	5.057541	.815	-19.46284	10.56784
		140-B + L.3.1	.025000	5.057541	1.000	-14.99034	15.04034
	L.3.1	K (+)	-4.302500	5.057541	.829	-19.31784	10.71284
		140-B	4.447500	5.057541	.815	-10.56784	19.46284
		140-B + L.3.1	4.472500	5.057541	.813	-10.54284	19.48784
	140-B + L.3.1	K (+)	-8.775000	5.057541	.349	-23.79034	6.24034
		140-B	-.025000	5.057541	1.000	-15.04034	14.99034
		L.3.1	-4.472500	5.057541	.813	-19.48784	10.54284

PAL

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Tukey HSD ^a			
140-B + L.3.1	4		127.04250
140-B	4		145.58250
L.3.1	4		161.41500
K (+)	4		187.04250
Sig.			.167

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

TAL

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Tukey HSD ^a			
140-B + L.3.1	4		25.69000
140-B	4		25.71500
L.3.1	4		30.16250
K (+)	4		34.46500
Sig.			.349

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Lampiran 16. Hasil uji ANOVA satu arah pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang tidak diinokulasi *Foc*

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
tinggi_0 K (-)	4	13.125	.6292	.3146	12.124	14.126	12.5	14.0
K (140-B)	4	14.125	.4787	.2394	13.363	14.887	13.5	14.5
K (L.3.1)	4	13.375	1.1087	.5543	11.611	15.139	12.0	14.5
Total	12	13.542	.8382	.2420	13.009	14.074	12.0	14.5
Tinggi_14 K (-)	4	13.5000	.57735	.28868	12.5813	14.4187	13.00	14.00
K (140-B)	4	16.5000	1.00000	.50000	14.9088	18.0912	15.00	17.00

K (L.3.1)	4	19.1250	1.43614	.71807	16.8398	21.4102	17.50	21.00
Total	12	16.3750	2.58602	.74652	14.7319	18.0181	13.00	21.00
Tinggi_30 K (-)	4	14.6250	2.62599	1.31300	10.4465	18.8035	13.00	18.50
K (140-B)	4	24.0000	3.55903	1.77951	18.3368	29.6632	19.00	27.00
K (L.3.1)	4	27.1250	2.28674	1.14337	23.4863	30.7637	24.50	30.00
Total	12	21.9167	6.12682	1.76866	18.0239	25.8095	13.00	30.00

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
tinggi_0	Between Groups	2.167	2	1.083	1.753	.228
	Within Groups	5.562	9	.618		
	Total	7.729	11			
Tinggi_14	Between Groups	63.375	2	31.688	27.994	.000
	Within Groups	10.188	9	1.132		
	Total	73.562	11			
Tinggi_30	Between Groups	338.542	2	169.271	20.483	.000
	Within Groups	74.375	9	8.264		
	Total	412.917	11			

Lampiran 17. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang tidak diinokulasi *Foc*

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
tinggi_0 Tukey HSD	K (-)	K (140-B)	-1.0000	.5559	.224	-2.552	.552
		K (L.3.1)	-.2500	.5559	.896	-1.802	1.302
	K (140-B)	K (-)	1.0000	.5559	.224	-.552	2.552
		K (L.3.1)	.7500	.5559	.405	-.802	2.302
	K (L.3.1)	K (-)	.2500	.5559	.896	-1.302	1.802
		K (140-B)	-.7500	.5559	.405	-2.302	.802
Tinggi_14 Tukey HSD	K (-)	K (140-B)	-3.00000	.75231	.008	-5.1005	-.8995
		K (L.3.1)	-5.62500	.75231	.000	-7.7255	-3.5245
	K (140-B)	K (-)	3.00000	.75231	.008	.8995	5.1005
		K (L.3.1)	-2.62500	.75231	.017	-4.7255	-.5245

	K (L.3.1)	K (-)	5.62500	.75231	.000	3.5245	7.7255
		K (140-B)	2.62500	.75231	.017	.5245	4.7255
Tinggi_30 Tukey HSD	K (-)	K (140-B)	-9.37500	2.03272	.003	-15.0504	-3.6996
		K (L.3.1)	-12.50000	2.03272	.000	-18.1754	-6.8246
	K (140-B)	K (-)	9.37500	2.03272	.003	3.6996	15.0504
		K (L.3.1)	-3.12500	2.03272	.320	-8.8004	2.5504
	K (L.3.1)	K (-)	12.50000	2.03272	.000	6.8246	18.1754
		K (140-B)	3.12500	2.03272	.320	-2.5504	8.8004

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

tinggi_0

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Tukey HSD ^a			
K (-)	4	13.125	
K (L.3.1)	4	13.375	
K (140-B)	4	14.125	
Sig.			.224

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Tinggi_14

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a				
K (-)	4	13.5000		
K (140-B)	4		16.5000	
K (L.3.1)	4			19.1250
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Tinggi_30

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a			
K (-)	4	14.6250	
K (140-B)	4		24.0000
K (L.3.1)	4		27.1250
Sig.		1.000	.320

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Lampiran 18. Hasil uji ANOVA satu arah pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang diinokulasi *Foc*

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
tinggi_0 K (+)	4	12.875	.8539	.4270	11.516	14.234	12.0	14.0
140-B + Foc	4	14.375	.6292	.3146	13.374	15.376	13.5	15.0
L.3.1 + Foc	4	13.625	.4787	.2394	12.863	14.387	13.0	14.0
140-B + L.3.1 + Foc	4	14.000	.7071	.3536	12.875	15.125	13.0	14.5
Total	16	13.719	.8360	.2090	13.273	14.164	12.0	15.0
Tinggi_14 K (+)	4	13.2500	1.55456	.77728	10.7763	15.7237	12.00	15.50
140-B + Foc	4	16.1250	1.10868	.55434	14.3608	17.8892	15.00	17.50
L.3.1 + Foc	4	16.3750	1.10868	.55434	14.6108	18.1392	15.00	17.50
140-B + L.3.1 + Foc	4	16.3750	2.49583	1.24791	12.4036	20.3464	14.00	19.00
Total	16	15.5312	2.02047	.50512	14.4546	16.6079	12.00	19.00
Tinggi_30 K (+)	4	14.3750	3.14576	1.57288	9.3694	19.3806	12.00	19.00
140-B + Foc	4	21.3750	4.42295	2.21148	14.3371	28.4129	16.00	25.00
L.3.1 + Foc	4	23.5000	3.10913	1.55456	18.5527	28.4473	20.00	27.00
140-B + L.3.1 + Foc	4	22.5000	5.00000	2.50000	14.5439	30.4561	15.00	25.00
Total	16	20.4375	5.14741	1.28685	17.6946	23.1804	12.00	27.00

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
tinggi_0	Between Groups	4.922	3	1.641	3.539	.048
	Within Groups	5.562	12	.464		
	Total	10.484	15			
Tinggi_14	Between Groups	27.922	3	9.307	3.353	.055
	Within Groups	33.312	12	2.776		
	Total	61.234	15			
Tinggi_30	Between Groups	205.062	3	68.354	4.264	.029
	Within Groups	192.375	12	16.031		
	Total	397.438	15			

Lampiran 19. Hasil uji lanjut Tukey α 0,05 pada tinggi tanaman pisang Cavendish yang diinokulasi *Foc*

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
							Lower Bound	Upper Bound	
tinggi_0	Tukey HSD	K (+)	140-B + Foc	-1.5000 [*]	.4814	.039	-2.929	-.071	
			L.3.1 + Foc	-.7500	.4814	.436	-2.179	.679	
			140-B + L.3.1 + Foc	-1.1250	.4814	.144	-2.554	.304	
		140-B + Foc	K (+)	1.5000 [*]	.4814	.039	.071	2.929	
			L.3.1 + Foc	.7500	.4814	.436	-.679	2.179	
			140-B + L.3.1 + Foc	.3750	.4814	.863	-1.054	1.804	
	L.3.1 + Foc	K (+)	.7500	.4814	.436	-.679	2.179		
		140-B + Foc	-.7500	.4814	.436	-2.179	.679		
		140-B + L.3.1 + Foc	-.3750	.4814	.863	-1.804	1.054		
	140-B + L.3.1 + Foc	K (+)	1.1250	.4814	.144	-.304	2.554		
		140-B + Foc	-.3750	.4814	.863	-1.804	1.054		
		L.3.1 + Foc	.3750	.4814	.863	-1.054	1.804		
Tinggi_14		Tukey HSD	K (+)	140-B + Foc	-2.87500	1.17814	.122	-6.3728	.6228
				L.3.1 + Foc	-3.12500	1.17814	.086	-6.6228	.3728
				140-B + L.3.1 + Foc	-3.12500	1.17814	.086	-6.6228	.3728
140-B + Foc	K (+)		2.87500	1.17814	.122	-.6228	6.3728		
	L.3.1 + Foc		-.25000	1.17814	.996	-3.7478	3.2478		
	140-B + L.3.1 + Foc		-.25000	1.17814	.996	-3.7478	3.2478		
L.3.1 + Foc	K (+)	3.12500	1.17814	.086	-.3728	6.6228			
	140-B + Foc	.25000	1.17814	.996	-3.2478	3.7478			
	140-B + L.3.1 + Foc	.00000	1.17814	1.000	-3.4978	3.4978			
140-B + L.3.1 + Foc	K (+)	3.12500	1.17814	.086	-.3728	6.6228			
	140-B + Foc	.25000	1.17814	.996	-3.2478	3.7478			
	L.3.1 + Foc	.00000	1.17814	1.000	-3.4978	3.4978			
	Tinggi_30	Tukey HSD	K (+)	140-B + Foc	-7.00000	2.83119	.116	-15.4055	1.4055
				L.3.1 + Foc	-9.12500 [*]	2.83119	.032	-17.5305	-.7195
				140-B + L.3.1 + Foc	-8.12500	2.83119	.059	-16.5305	.2805
140-B + Foc	K (+)		7.00000	2.83119	.116	-1.4055	15.4055		
	L.3.1 + Foc		-2.12500	2.83119	.875	-10.5305	6.2805		
	140-B + L.3.1 + Foc		-1.12500	2.83119	.978	-9.5305	7.2805		
L.3.1 + Foc	K (+)	9.12500 [*]	2.83119	.032	.7195	17.5305			
	140-B + Foc	2.12500	2.83119	.875	-6.2805	10.5305			

	140-B + L.3.1 + Foc		1.00000	2.83119	.984	-7.4055	9.4055
140-B + L.3.1 + Foc	K (+)		8.12500	2.83119	.059	-2.2805	16.5305
	140-B + Foc		1.12500	2.83119	.978	-7.2805	9.5305
	L.3.1 + Foc		-1.00000	2.83119	.984	-9.4055	7.4055

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

tinggi_0

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a K (+)	4	12.875	
L.3.1 + Foc	4	13.625	13.625
140-B + L.3.1 + Foc	4	14.000	14.000
140-B + Foc	4		14.375
Sig.		.144	.436

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Tinggi_14

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a K (+)	4	13.2500	
140-B + Foc	4	16.1250	
L.3.1 + Foc	4	16.3750	
140-B + L.3.1 + Foc	4	16.3750	
Sig.		.086	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Tinggi_30

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a K (+)	4	14.3750	
140-B + Foc	4	21.3750	21.3750
140-B + L.3.1 + Foc	4	22.5000	22.5000
L.3.1 + Foc	4		23.5000
Sig.		.059	.875

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.