

Keefektifan Senyawa Bioaktif Klon Pustaka Metagenomik sebagai Biokontrol *Meloidogyne incognita* dan Pemacu Pertumbuhan Tanaman

Effectiveness of the Bioactive Compound from Metagenomic Library Clones as Biocontrol of *Meloidogyne incognita* and Plant Growth Promoter

Ade Indra Maulana Sembiring, Giyanto, Supramana*

Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

(diterima Desember 2023, disetujui Maret 2024)

ABSTRAK

Metagenomik merupakan teknik untuk mengeksplorasi sumber daya kekayaan genetik mikroba pada suatu lingkungan, termasuk mikroba yang dapat berperan sebagai agens biokontrol. Penelitian ini bertujuan mengetahui keefektifan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh isolat klon pustaka metagenomik asal kakao (PMP7, PMC8, PMS14, PMC3, PMC13, PMC14, dan PMS11) sebagai agens pengendalian nematoda puru akar *Meloidogyne incognita* dan pemacu pertumbuhan tanaman. Pengujian *in vitro* dilakukan menggunakan filtrat senyawa bioaktif dari tujuh klon pustaka metagenomik terhadap juvenil 2 nematoda pada cawan petri. Nematoda yang diberi perlakuan senyawa bioaktif diinkubasikan pada suhu 27 °C dan diamati mortalitasnya pada 24 jam setelah perlakuan. Karakterisasi fisiologi yang dilakukan terhadap isolat adalah pengujian produksi HCN, enzim kitinase, dan enzim protease. Pengujian secara *in planta* dilakukan pada tanaman mentimun var. Kitoh yang ditanam pada polibag. Nematoda juvenil 2 diinfestasikan pada masing-masing polibag dan perlakuan senyawa bioaktif diberikan dengan menyiramkan suspensi pada 14 dan 30 hari setelah tanam. Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga puru terbentuk pada perakaran tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tujuh isolat klon pustaka metagenomik memiliki kemampuan nematisidal dengan tingkat mortalitas *in vitro* mencapai 96%–100% dan mampu memproduksi enzim protease dengan indeks proteolitik mencapai 0.13–0.6. Pada uji *in planta* isolat PMS11 mampu menekan keparahan puru akar dengan keefektifan penekanan mencapai 54.63%. Dua isolat, yaitu PMC8 dan PMS14 memiliki kemampuan memacu pertumbuhan tanaman yang terbaik.

Kata kunci: enzim protease, mortalitas, nematisidal, puru akar

ABSTRACT

Metagenomics is a technique for exploring the genetic diversity of microbes in an environment, including those that can act as biocontrol agents. This research aims to determine the effectiveness of bioactive compounds produced by the isolates of metagenomic library clones from cocoa (PMP7, PMC8, PMS14, PMC3, PMC13, PMC14, and PMS11) as agents for controlling root knot nematode

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Jawa Barat 16680.
Tel: +62 251 8629364, Faks: +62 251 8629364, Surel: supramana@apps.ipb.ac.id

Meloidogyne incognita and promoting plant growth. *In vitro* testing was carried out using filtrates of bioactive compounds from seven metagenomic library clones on juvenile 2 nematodes in petri dishes. Nematodes treated with bioactive compounds were incubated at 27 °C and their mortality was observed 24 hours after treatment. The physiological characterization carried out on the clone isolates involved the production of HCN, chitinase and protease enzymes. *In planta* testing was carried out on cucumber plants var. Kitoh which were planted in polybags. Juvenile 2 nematodes were infested in each polybag and bioactive compound was given by watering the suspension at 14 and 30 days after planting. Observations were conducted every week until galls were formed on the plant roots. The results showed that seven isolates of metagenomic library clones had nematicidal effect with an *in vitro* mortality rate of 96%–100% and were able to produce protease enzymes with a proteolytic index of 0.13–0.6. In the *in planta* test, PMS11 isolate was able to suppress the severity of root knots with suppression effectiveness reaching 54.63%. Two isolates, i.e. PMC8 and PMS14, showed the best ability to stimulate plant growth.

Keywords: mortality, nematicidal, protease enzyme, root gall

PENDAHULUAN

Metagenomik merupakan teknik dasar penggunaan biologi molekuler untuk menganalisis sumber daya kekayaan genetik mikrob dari sampel lingkungan (Cortes-Lopez *et al.* 2020). Teknik ini memungkinkan diperolehnya gen-gen fungsional baru seperti gen pengkode antibiotik, enzim, maupun senyawa volatil antimikrob yang berasal dari mikrob yang tidak dapat dikulturkan pada medium buatan (Sessitsch *et al.* 2012). Borneman *et al.* (1996) menyatakan bahwa hanya 1% mikrob di alam yang dapat dikulturkan pada kondisi laboratorium sehingga sebagian besar yakni 99% mikrob yang tidak dapat dikulturkan belum diketahui potensinya. Teknik metagenomik sangat berpotensi untuk mempelajari gen-gen fungsional yang dapat digunakan dalam pengendalian patogen tumbuhan. Sessitsch *et al.* (2012) telah menggunakan pendekatan metagenomik untuk menganalisis potensi bakteri endofit yang berasosiasi pada akar tanaman padi yang salah satunya berperan sebagai agens biokontrol terhadap patogen. Selain itu, pemanfaatan teknik metagenomik juga dilakukan oleh Permana (2018) dalam menginduksi ketahanan tanaman kakao terhadap penyakit yang disebabkan oleh cendawan. Oleh karena itu, pendekatan yang sama juga dapat dilakukan untuk mengendalikan patogen tanaman dari kelompok lain seperti nematoda parasit tumbuhan.

Salah satu genus dari nematoda yang bersifat parasit pada tumbuhan yakni, nematoda puru akar (*Meloidogyne*). Patogen ini merupakan genus nematoda yang memiliki kisaran inang yang luas yang diperkirakan lebih dari 5500 spesies tumbuhan (Trudgill dan Blok 2001). Nematoda ini dapat menyebabkan kerugian secara langsung maupun tidak langsung pada tanaman budi daya. Tanaman budi daya yang terserang nematoda puru akar akan terganggu pertumbuhannya sehingga mengakibatkan kematian pada serangan berat yang menyebabkan penurunan produktivitas hasil budidaya (Mursyalatiyus 2018). Salah satu spesies nematoda yang menyebabkan kerugian secara ekonomi ialah *Meloidogyne incognita*.

Umumnya pengendalian nematoda puru akar (NPA) dilakukan dengan penggunaan nematisida sintetik, penggunaan kultivar resisten, dan rotasi tanaman (Luc *et al.* 2005). Akan tetapi, pengendalian menggunakan nematisida sintetik sering menyebabkan dampak yang buruk bagi lingkungan. Penggunaan kultivar resisten secara terus menerus dan dalam jangka waktu yang lama dapat berubah menjadi tidak stabil akibat munculnya biotipe atau ras patogen baru (Carolan *et al.* 2017). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji keefektifan isolat klon pustaka metagenomik asal tanaman kakao dalam memacu pertumbuhan tanaman dan mengendalikan nematoda puru akar *M. incognita*.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan dan Perbanyakan *Meloidogyne* spp.

Inokulum nematoda puru akar *Meloidogyne* spp. diambil dari tanaman tomat yang menunjukkan gejala menguning dan kerdil serta pada bagian akarnya terdapat puru yang disebabkan oleh *Meloidogyne* spp. Perbanyakan inokulum uji diambil dari satu paket telur yang akan diinfestasikan pada perakaran satu tanaman tomat untuk mendapatkan spesies yang sama. Tanaman tomat ditanam pada polibag yang terdiri atas medium tanah yang disterilisasikan menggunakan autoklaf untuk mengurangi kontaminasi patogen lainnya. Setiap satu paket telur diinkubasi pada satu cawan petri berdiameter 9 cm berisi air steril sebanyak 6 mL selama tiga hari dua malam pada suhu ruangan 27 °C hingga menetas menjadi juvenil 2 (J2) (Efendi *et al.* 2021). Satu paket telur yang telah menetas menjadi juvenil 2 memiliki kerapatan populasi berkisar 100 ekor per mL dan diinfestasikan pada perakaran satu tanaman tomat berusia 2 minggu setelah tanam (MST) pada polibag dengan medium tanah steril. Setelah tanaman tomat pada polibag bergejala puru dilakukan identifikasi spesies *Meloidogyne* berdasarkan karakter morfologinya dengan mengamati pola perineal nematoda betina yang mengacu pada *A Guide to The Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne spp.)*, *With a Pictorial Key Genera* (Eisenback *et al.* 1981).

Pengujian *in Vitro* Filtrat Klon Pustaka Metagenomik terhadap Nematoda Puru Akar

Pengujian *in vitro* klon pustaka metagenomik (KPM) dilakukan untuk melihat pengaruh senyawa bioaktif pada filtrat KPM terhadap mortalitas J2 NPA. Persiapan supernatan filtrat KPM mengacu pada metode penelitian Sastrini (2016) yang dimodifikasi tanpa menggunakan *shaker waterbath*. Sebanyak 7 isolat klon pustaka metagenomik asal tanaman kakao, yaitu PMC3, PMC8, PMC13, PMS11, PMS14, PMP7, dan PMC14 koleksi dari Laboratorium

Bakteriologi Tumbuhan, Fakultas pertanian, IPB University masing-masing klon ditumbuhkan pada 50 mL medium Luria Bertani (LB) (0.5 g pepton, 0.25 g ekstrak yeast, 0.25 g NaCl, dan 50 mL air) dan ditambahkan 50 µg mL⁻¹ ampisilin dan diinkubasi pada *shaker* 150 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya, suspensi ditambahkan *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) pada saat konsentrasi isolat KPM mencapai OD600 = 0.9-1.5 (fase logaritmik) kemudian diinkubasi kembali pada kondisi yang sama selama empat hari. Suspensi selanjutnya disentrifugasi (Thermo Scientific, Jerman) pada kecepatan 10 000 rpm selama 20 menit dan dilanjutkan dengan disaring menggunakan *milipore* berukuran 0.22 µm (Membran Solution, Amerika Serikat). Pengujian *in vitro* mengacu kepada metode Chen *et al.* (2018) yang dilakukan modifikasi pada jumlah J2 yang digunakan serta waktu inkubasi pengamatan yang dilakukan. Nematoda J2 hasil perbanyakan diekstraksi kemudian dipanen dan diamati menggunakan mikroskop stereo, serta dihitung menggunakan *hand counter*. Juvenil 2 *M. incognita* dihitung hingga mendapatkan jumlah individu 35 individu per 0.5 mL untuk dilakukan pengujian. Sebanyak 4.5 mL filtrat 100% dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan 35 individu J2 *M. incognita* lalu diinkubasi pada suhu ruang. Percobaan dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan yang terdiri atas perlakuan filtrat KPM dan kontrol air. Pengamatan dilakukan pada 24 jam inkubasi. Setelah 24 jam, nematoda dibilas menggunakan air steril untuk menghentikan pengaruh nematisidal. Selanjutnya nematoda diinkubasi selama 4 jam pada air steril untuk memastikan efek nematisidal dari senyawa bioaktif pada filtrat KPM. Mortalitas terkoreksi nematoda dihitung menggunakan rumus seperti berikut:

$$Pt = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100\%, \text{ dengan}$$

Pt, % kematian terkoreksi; Po, % kematian pada perlakuan; dan Pc, % kematian pada kontrol.

Pengujian Produksi HCN

Pengujian produksi HCN dilakukan dengan menggunakan metode Wei *et al.* (1991) yang dimodifikasi menggunakan perendaman kertas saring pada larutan *cyanide detection solution* (CDS) (2 g asam pikrat dan 8 g sodium karbonat (Na_2CO_3) dalam 200 mL akuades steril). Isolat klon pustaka metagenomik digoreskan pada medium *tryptone soy agar* (TSA) [30 g *tryptone soy broth* (TSB) (Himedia, India), 20 g agar bakto (Thermo Scientific, Jerman), 1000 mL akuades] + 4.4 g L^{-1} glisin yang mengandung 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilin dan IPTG. Pada bagian tutup cawan petri diletakkan kertas saring berukuran 1 cm \times 1 cm yang telah direndam dengan larutan CDS hingga berwarna kuning, lalu diinkubasi selama 7 hari. Adanya produksi HCN ditandai oleh adanya perubahan warna kertas saring dari kuning cerah menjadi oranye kemerahan.

Pengujian Aktivitas Kitinolitik

Pengujian aktivitas kitinolitik mengacu pada metode Hariprasad *et al.* 2011 yang dimodifikasi menggunakan koloidal kitin 0.4%. Koloni tunggal isolat pustaka metagenomik yang berumur 24 jam digoreskan pada medium kitin steril [30 g TSB (Himedia, India), 20 g agar bakto (Thermo Scientific, Jerman), 1000 mL akuades] yang ditambah dengan koloidal kitin 0.4%. Pada medium tersebut ditambahkan 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilin dan IPTG. Perlakuan diinkubasi pada suhu ruang selama 24–72 jam. Zona bening pada medium akan terbentuk di sekitar koloni yang mampu menghasilkan enzim kitinase. Kemampuan degradasi kitin diukur dari waktu yang dibutuhkan lebih cepat dan indeks lisis. Pengukuran indeks lisis berdasarkan Muharni dan Widjajanti (2011)

$$\text{Indeks lisis} = \frac{(A - B)}{B}, \text{ dengan}$$

A, diameter zona bening dan B, koloni bakteri.

Pengujian Aktivitas Proteolitik

Pengujian proteolitik menggunakan medium *skim milk agar* (SMA). Medium SMA dibuat dengan mencampurkan 30 g medium (TSB) (Himedia, India) dengan 20 g agar bakto

(Thermo Scientific, Jerman) yang ditambahkan 900 mL akuades, 100 mL susu skim, dan 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilin dan IPTG. Suspensi klon pustaka metagenomik digoreskan pada medium SMA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dan diamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni (Baehaki dan Budiman 2011).

Uji Keefektifan Senyawa Bioaktif Klon Pustaka Metagenomik dalam Menekan Keparahan Penyakit Puru Akar

Pengujian keefektifan senyawa bioaktif pada filtrat KPM dilakukan untuk melihat kemampuannya dalam menekan keparahan penyakit puru akar *M. incognita* dan pemacu pertumbuhan tanaman di rumah kaca. Benih mentimun varietas Kitoh (Tohoku Seed Co, Jepang) yang telah disterilisasi permukaan direndam pada filtrat selama 45 menit. Kemudian benih ditanam pada polibag berukuran 30 cm \times 30 cm dengan medium tanah dan pasir steril 1:1 (v/v) yang disterilisasikan menggunakan autoklaf. Pada usia tanaman 2 dan 4 minggu tanaman diberikan filtrat kembali sebanyak 10 mL dengan perbandingan 1:9 (filtrat:air steril). Pemberian filtrat dilakukan pada pangkal batang tanaman sebanyak 2 kali (2 dan 4 MST). Selanjutnya, sebanyak 500 ekor J2 *M. incognita* diinfestasikan pada tanaman setelah tiga hari pemberian filtrat pada 2 MST. Seluruh perlakuan diinfestasikan nematoda J2 dengan tanaman kontrol tanpa pemberian filtrat KPM. Percobaan dilakukan dengan RAL yang terdiri dari 5 ulang yang setiap ulangnya terdapat 3 unit tanaman. Pengamatan karakteristik agronomis dilakukan setiap minggu selama 4 minggu setelah J2 diinfestasikan (Munif *et al.* 2013). Minggu terakhir pengamatan dilakukan perhitungan jumlah puru akar dan perhitungan bobot kering tanaman, serta perhitungan persentasi keefektifan isolat KPM dalam menekan populasi nematoda di akar menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ keefektifan} = \frac{\sum P_0 - P_t}{\sum P_0} \times 100\%, \text{ dengan}$$

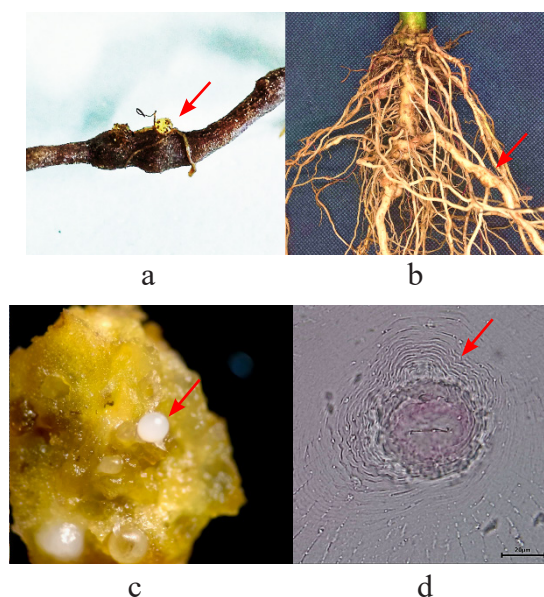
P_0 , puru pada akar tanaman kontrol; dan P_t , puru pada tanaman perlakuan.

Skor keparahan penyakit puru akar mengacu pada skala persentase keparahan penyakit oleh Barker (1985) dan dilakukan modifikasi menjadi perhitung jumlah puru akar dengan skala skoring 0–5. Skor 0, tanaman tidak memiliki puru; 1, terdapat 10 sampai 20 puru; 2, terdapat 21 sampai 50 puru; 3, terdapat 51 sampai 80 puru; 4, terdapat 81 sampai 100 puru; dan 5, terdapat lebih dari 100 puru.

HASIL

Spesies Nematoda Puru Akar

Paket telur yang diinfestasikan memiliki ciri berbentuk bulat berwarna putih (Gambar 1a). Tanaman tomat yang diinfestasikan satu paket telur *Meloidogyne* spp. menunjukkan gejala puru akar pada 2 bulan setelah inokulasi. Gejala puru akar yang terbentuk akibat infeksi J2 *M. incognita* yang menyebabkan sel membengkak (Gambar 1b). Akar yang berpuu diamati di bawah mikroskop stereoskopik



Gambar 1 Nematoda puru akar hasil perbanyakan pada tanaman tomat. a, paket telur; b, puru pada akar; c, nematoda betina dewasa; dan c, pola perineal *Meloidogyne incognita* pada perbesaran 40 × 10.

(Figure 1 Root-knot nematodes propagated on tomato plants. a, egg package; b, knots on roots; c, adult female nematode; and c, perineal pattern of *Meloidogyne incognita* at 40 × 10 magnification)

menunjukkan keberadaan nematoda betina dalam jaringan akar yang berbentuk seperti buah pir (*pyriform*) berwarna putih mengkilat (Gambar 1c). Hasil identifikasi morfologi menggunakan pola perineal nematoda betina menunjukkan nematoda hasil perbanyakan merupakan *M. incognita*. Pola perineal yang terdapat pada spesies nematoda ini memiliki ciri khas dengan lengkungan dorsal yang tinggi dan menyempit (Gambar 1d).

Mortalitas Nematoda pada Perlakuan Senyawa Bioaktif

Senyawa bioaktif pada filtrat KPM asal tanaman kakao menyebabkan mortalitas J2 *M. incognita* 96%–100%. Hal tersebut dilihat dari tidak Bergeraknya nematoda J2 pada pengamatan 24 jam perlakuan filtrat lalu dicuci dan diinkubasi selama 4 jam untuk menghilangkan kandungan filtrat pada nematoda. Tujuh isolat bakteri, yaitu: PMC3, PMC8, PMC13, PMS11, PMS14, PMP7, dan PMC14 memberikan pengaruh penekanan yang nyata terhadap J2 *M. incognita* dibandingkan perlakuan kontrol (Tabel 1).

Tabel 1 Mortalitas juvenil (J2) *Meloidogyne incognita* secara in vitro pada perlakuan filtrat tujuh klon pustaka metagenomik dan diinkubasi 4 jam setelah dibilas

(Table 1 In vitro mortality of juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita* treated with filtrates of seven metagenomic library clones and incubated for 4 hours after rinsing)

Kode isolat (Isolate code)	Mortalitas terkoreksi (Corrected mortality) (%) [*]
Kontrol air (Water control)	0.00 a
PMC3	100.00 b
PMC8	98.88 b
PMC13	100.00 b
PMS11	100.00 b
PMS14	100.00 b
PMP7	95.54 b
PMC14	97.89 b

^{*}Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji Tukey α 5%. (Value followed by the same letter in the same column are not significantly different based on the Tukey α test at a 5%). significant difference in the Tukey α test of 0.05).

Karakteristik Fisiologi Isolat Bakteri Klon Pustaka Metagenomik

Hasil pengujian menunjukkan seluruh isolat klon pustaka metagenomik tidak mampu menghasilkan enzim kitinase dan senyawa hidrogen sianida (Tabel 2). Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening pada medium kitin dan tidak terjadi perubahan warna pada kertas saring (Gambar 2 a-b). Akan tetapi, semua isolat mampu memproduksi enzim protease dengan terbentuknya zona bening pada medium *skim milk agar*. Isolat bakteri klon pustaka metagenomik PMS14, PMC3, PMC8, dan PMP7 menghasilkan senyawa protease tertinggi, yaitu 0.51–0.61 (Tabel 3).

Keefektifan Penekanan Puru Akar Secara *In Planta*

Data yang didapat menunjukkan seluruh isolat klon pustaka metagenomik mampu

menekan keparahan puru akar secara *in planta*. Ketujuh isolat klon pustaka metagenomik menunjukkan pengaruh penekanan yang berbeda nyata dibandingkan kontrol. Isolat PMS11 menunjukkan skala kerusakan terkecil yakni 2.6 dengan rata-rata jumlah puru mencapai 53 puru pada perakaran tanaman uji. Isolat tersebut juga memiliki keefektifan penekan puru sebesar 54.63% yang merupakan persentase keefektifan penekanan puru akar tertinggi (Tabel 4).

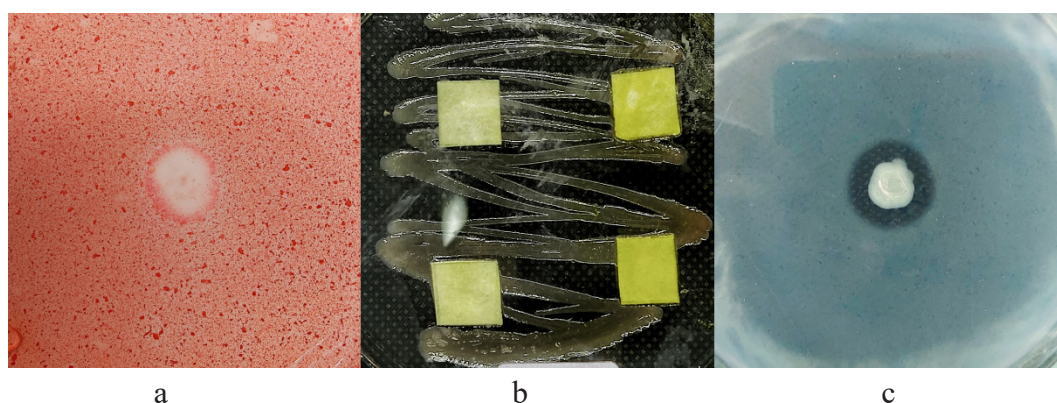
Pengaruh Isolat Bakteri Terhadap Pertumbuhan Tanaman

Tanaman yang diberi perlakuan filtrat senyawa bioaktif KPM menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan kontrol pada tinggi tanaman. Akan tetapi, tanaman yang diberi perlakuan filtrat senyawa bioaktif isolat PMC 8 dan PMS14 memiliki rata-rata

Tabel 2 Mekanisme antagonisme secara *in vitro* tujuh isolat klon pustaka metagenomik asal kakao terhadap *Meloidogyne incognita*

(Table 2 *In vitro* antagonistic mechanism of seven metagenomic library isolates from cocoa against *Meloidogyne incognita*)

Uji fisiologis (Physiological tests)	Kode isolat (Isolate code)						
	PMC3	PMC8	PMC13	PMC14	PMP7	PMS11	PMS14
HCN	-	-	-	-	-	-	-
Kitinolitik (<i>Chitinolytic</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Proteolitik (<i>Proteolytic</i>)	+	+	+	+	+	+	+



Gambar 2 Karakter fisiologi isolat bakteri klon pustaka metagenomik. a, bakteri tidak menghasilkan senyawa enzim kitinase; b, bakteri tidak menghasilkan senyawa HCN; dan c, bakteri memproduksi enzim protease (terbentuknya zona bening).

(Figure 2 Physiological characteristics of bacterial isolates from metagenomic library clones. a, bacteria do not produce chitinase enzyme compounds; b, bacteria do not produce HCN compounds; and c, bacteria produce protease enzymes (clear zone formed)).

Tabel 3 Indeks proteolitik dari tujuh isolat klon pustaka metagenomik asal kakao pada inkubasi 24 jam
(Table 3 Proteolytic index of seven metagenomic library isolates from cocoa after 24 hours of incubation)

Perlakuan (Treatment)	Diameter koloni bakteri (Bacterial colony diameter) (mm)	Diameter zona bening (Clear zone diameter) (mm)	Indeks proteolitik (Proteolytic Index)
PMS14	7.75 a	11.25 a	0.45 a
PMC3	9.58 ab	13.92 abc	0.46 a
PMC14	10.58 abc	12.58 ab	0.19 a
PMS11	11.25 abc	16.75 cd	0.49 a
PMC8	13.00 bc	19.42 de	0.50 a
PMC13	13.83 c	16.08 bcd	0.16a
PMP7	14.25 c	21.33 e	0.53 a

*Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji Tukey α 5%. (Value followed by the same letter in the same column are not significantly different based on based on Tukey's test at α 5%).

Tabel 4 Keefektifan tujuh senyawa bioaktif isolat klon pustaka metagenomik asal kakao dalam menekan keparahan penyakit puru akar *Meloidogyne incognita* secara in planta
(Table 4 Effectiveness of seven bioactive compounds of metagenomic library clone isolates from cacao in suppressing severity of root knot disease in planta caused by *Meloidogyne incognita*)

Kode isolat (Isolate code)	Jumlah puru akar per tanaman (Number of root galls per plant)	Keefektifan penekanan puru akar (Effectiveness of emphasis root knot) (%)	Skala kerusakan akar ^a (Scale of root damage ^a)
Kontrol (Control)	124 b	0.00 a	4.5 c
PMP7	69 a	40.55 b	3.1 ab
PMC8	78 a	33.65 ab	3.6 b
PMS14	65 a	43.64 b	3.1 ab
PMC3	72 a	36.70 b	3.1 ab
PMC13	62 a	46.16 b	3.0 ab
PMC14	64 a	44.58 b	2.9 ab
PMS11	53 a	54.63 b	2.6 a

*Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji Tukey α 5% (Value followed by the same letter in the same column are not significantly different based on based on Tukey's test at α 5%).

^aData telah ditransformasikan dengan transformasi logaritma. (Data has been transformed with logarithmic transformation).

diameter batang, bobot kering tajuk, bobot kering akar, serta jumlah daun dan bunga yang berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Isolat PMC8 dan PMS14 memiliki persentase peningkatan bobot kering tajuk tertinggi, yaitu mencapai 155% dan 135% dibandingkan dengan kontrol. Kedua isolat juga memberikan pengaruh yang sangat baik terhadap kecepatan dan jumlah bunga yang dihasilkan tanaman. Kedua isolat juga menunjukkan pengaruh terhadap jumlah bunga yang terbentuk yakni,

mencapai 7.73 dan 6.27 bunga pada usia tanaman 6 minggu (Tabel 5).

PEMBAHASAN

Nematoda *M. incognita* hasil perbanyakan berhasil diidentifikasi secara morfologi melalui pengamatan pola perineal. Nematoda yang diperbanyak dari satu paket telur memiliki keragaman spesies yang sama, yaitu *M. incognita*. Nematoda ini memiliki ciri

Tabel 5 Pengaruh tujuh senyawa bioaktif isolat bakteri klon pustaka metagenomik asal kakao terhadap pertumbuhan tanaman mentimun di rumah kaca pada 6 minggu setelah tanam

(Table 5 Effect of seven bioactive compounds of metagenomic library clone bacterial isolates from cocoa on the growth of cucumber plants in the greenhouse at 6 weeks after planting)

Kode isolat (<i>Isolate code</i>)	Tinggi tanaman (<i>Plant height</i>) (cm)	Panjang akar (<i>Root length</i>) (cm)	Diameter batang (<i>Stem diameter</i>) (cm)	Bobot kering tajuk (<i>Shoot dry weight</i>) (g)	Bobot kering akar (<i>Root dry weight</i>) (g) ^a	Jumlah daun (<i>Number of laves</i>)	Jumlah bunga (<i>Number of flowers</i>) ^a
Kontrol (<i>Control</i>)	239.60 a	15.86 a	0.37 a	3.84 a	0.14 a	20.07 a	0.20 a
PMP7	237.60 a	21.16 abc	0.50 bc	6.52 cd	0.27 bc	21.73 ab	3.53 bc
PMC8	229.80 a	22.21 abc	0.45 b	7.75 d	0.35 cd	22.40 b	7.73 c
PMS14	222.93 a	24.08 bc	0.53 bc	7.15 cd	0.47 e	22.47 b	6.27 bc
PMC3	224.87 a	28.09 c	0.56 c	6.27 bc	0.44 de	22.00 ab	4.33 bc
PMC13	227.87 a	22.87 abc	0.56 c	4.96 ab	0.38 de	21.93 ab	4.93 bc
PMC 14	230.87 a	19.92 ab	0.56 c	5.05 ab	0.26 b	21.27 ab	2.73 b
PMS11	226.53 a	16.24 a	0.48 bc	3.93 a	0.23 b	19.80 a	0.27 a

Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji Tukey α 5%. (*Value followed by the same letter in the same column are not significantly different based on based on Tukey's test at α 5%*).

^aData telah ditransformasikan dengan transformasi logaritma. (*Data has been transformed with logarithmic transformation*).

morfologi khas pada daerah perinealnya yakni berupa struktur oval bersudut dengan lengkungan dorsal/punggung yang tinggi berbentuk V terbalik (Uysal *et al.* 2017).

Seluruh isolat bakteri klon pustaka metagenomik berpotensi sebagai agens pengendali *M. incognita* secara *in vitro*, yaitu PMC3, PMC8, PMC13, PMS11, PMS14, PMP7, dan PMC14. Isolat bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease yang mampu mematikan nematoda dengan presentase yang tinggi. Hal tersebut dapat terlihat dengan terbentuknya zona bening pada medium *skim milk agar* (SMA) akibat aktivitas lisisnya medium tersebut. Enzim protease dapat mendegradasi protein yang berhubungan dengan organ dalam dan kutikula, serta penghalang fisik yang melindungi nematoda (Geng *et al.* 2016). Menurut Tikhonove *et al.* (2002) enzim protease akan menghancurkan cangkang telur dan kutikula nematoda. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Thongkaewyuan dan Chairin (2018), pemberian ekstrak kasar enzim protease dari cendawan *Metarhizium guizhouense* mengakibatkan tidak terdeteksi adanya kandungan

protein pada telur dan J2 nematoda yang telah diberikan perlakuan tersebut. Hal ini menyebabkan terjadinya pembengkakan pada telur. Enzim protease juga akan menyebabkan cangkang telur nematoda kehilangan bentuknya akibat lapisan lipid bagian dalam luruh dan lapisan kitin bagian tengah menjadi tipis (Khan *et al.* 2004).

Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri klon pustaka metagenomik mampu menekan keparahan penyakit pada pengujian skala rumah kaca. Seluruh isolat berpotensi dapat menekan keparahan penyakit dengan keefektifan berkisar 33.65% hingga 54.63%. Hal tersebut dikarenakan senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri klon pustaka metagenomik dapat menghasilkan berbagai efek biologis, seperti senyawa yang dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap patogen maupun cekaman lingkungan (Doty *et al.* 2017). Salah satu mekanisme yang dilakukan untuk menginduksi ketahanan tanaman terhadap patogen ialah melalui *induction of the immune system respon* (ISR) pada tanaman inang (Nakkeeran *et al.* 2019).

Pengaruh senyawa bioaktif isolat bakteri klon pustaka metagenomik terhadap pertumbuhan tanaman mentimun ditunjukkan dengan perbedaan nyata karakter agronomis tanaman mentimun yang diberikan perlakuan dengan tanaman kontrol tanpa perlakuan. Tanaman yang diberi perlakuan memiliki karakter akar yang lebih panjang, diameter batang yang lebih besar, dan bobot kering yang lebih berat, serta jumlah daun dan bunga yang lebih banyak. Hal tersebut disebabkan adanya senyawa *plant growth promoting* yang terkandung dalam senyawa bioaktif isolat bakteri klon pustaka metagenomik. Beberapa genus bakteri dapat menghasilkan senyawa *plant growth promoting* dan menginduksi ketahanan tanaman. Bakteri yang banyak berperan sebagai antimikroba di antaranya dari genus *Bacillus* dan *Pseudomonas*. *Bacillus* spp. dapat menghasilkan banyak senyawa bioaktif seperti, senyawa volatil dan senyawa organik non volatil. Bakteri ini memiliki sekitar 4.5%–15.4% dari seluruh genomnya yang berkembang menyintesis senyawa antimikroba serta senyawa bioaktif lainnya tergantung dari spesies dan strainnya (Andric *et al.* 2020). *Pseudomonas* spp. memiliki spesies dan strain yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang berperan sebagai agens biokontrol pengendali penyakit tanaman, *plant growth promoting*, dan induksi sistem ketahanan tanaman (Couillerot *et al.* 2009). Hal ini disebabkan spesies dari genus ini memiliki genom pengkode senyawa bioaktif yang mensintesis senyawa antimikroba, siderofor, biosurfaktan, dan lainnya (Andreolli *et al.* 2018).

DAFTAR PUSTAKA

- Andreolli M, Zapparoli G, Angelini E, Lucchetta G, Lampis S, Vallini G. 2018. *Pseudomonas protegens* MP12: a plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiological Research*. 219(2019): 123–131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.003>.
- Andric S, Meyer T, Ongena M. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*. 11(1350):1–9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>.
- Baehaki A, Budiman A. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 22(1):37–42.
- Barker KR. 1985. *An Advanced Treatise on Meloidogyne, On Methodology Vol 2*. Raleigh (NC): North Carolina State University.
- Borneman J, Skroch PW, O’Sullivan KM, Palus JA, Rumjanek NG, Jansen JL, Nienhuis J, Triplett EW. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied Environmental Microbiology*. 62(6):1935–1943. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.62.6.1935-1943.1996>.
- Carolan K, Helps J, van den Berg F, Bain R, Paveley N, van den Bosch F. 2017. Extending the durability of cultivar resistance by limiting epidemic growth rates. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences*. 284:1–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.0828>.
- Chen D, Wang D, Xu C, Chen C, Li J, Wu W, Huang X, Xie H. 2018. Nematicidal protease genes screened from a soil metagenomic library to control *Radopholus similis* mediated by *Pseudomonas fluorescens* pf36. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(7):3301–3314. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8869-9>.
- Cortes-Lopez NG, Ordonez-Baquera PL, Dominguez-Viveros J. 2020. Molecular tool used for metagenomic analysis. *Review. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 11(4):1150–1173. DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>.
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moenne-Loccoz Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonas as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 48(5):

- 505–512. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472765X.2009.02566.x>.
- Doty SL, Freeman JL, Cohu CM, Burken JG, Firrincieli A, Simon A, Khan Z, Isebrands JG, Lukas J, Blaylock MJ. 2017. Enhanced degradation of TCE on a superfund site using endophyte-assisted poplar tree phytoremediation. *Environmental Science and Technology*. 51(17):10050–10058. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01504>.
- Efendi E, Supramana, Giyanto. 2021. Potensi isolat bakteri asal gambut sebagai agens pengendali nematoda puru akar *Meloidogyne incognita*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 17(6):243–250. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.17.6.243-250>.
- Eisenback JD, Hirschman H, Sasser JN, Triantaphyllou AC. 1981. A Guide to The Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.), With a Pictorial Key. Washington DC (US): Cooperative Publication Departement of Plant Pathology and US Agency International Development.
- Geng C, Nie X, Tang Z, Zhang Y, Lin J, Sun M, Peng D. 2016. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematocidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific Reports*. 6:25012. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep25012>.
- Hariprasad P, Divakara S, Niranjana S. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic bacteria for the management of Fusarium wilt in tomato. *Crop Protection*. 30(12):1606–1612. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.032>.
- Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological Control*. 31(3):346–352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.07.011>.
- Luc M, Sikora RA, Bridge J. 2005. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford (GB): CABI Publishing.
- Muharni, Widjajanti H. 2011. Skrining bakteri kitinolitik antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*) dari rizosfir tanaman karet. *Jurnal Penelitian Sains*. 14(1):51–56.
- Munif A, Hallmann J, Sikora RA. 2013. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. *Journal International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 19(2):68–74.
- Mursyalatuyus IDE. 2018. Potensi bakteri endofit asal tanaman tembakau sebagai agens biokontrol nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.) [tesis]. Bogor (ID): IPB University.
- Nakkeeran S, Vinodkumar S, Senthiraja C, Renukadevi P. 2019. Antimicrobial peptides of *Bacillus* species: Biosynthesis, mode of action and their role in plant disease management. Di dalam: Pandey RN, Chakraborty BN, Singh D, Sharma P, editor. *Microbial Antagonists: Their Role in Biological Control of Plant Diseases*. New Delhi (IN): Today & Tomorrow's Printers and Publishers. hlm 487–514.
- Permana I. 2018. Analisis fungsional dan genetik klon pustaka metagenom asal tanaman kakao (*Theobroma cacao*) sebagai penginduksi resistensi tanaman [skripsi]. Bogor (ID): IPB University.
- Sastrini T. 2016. Konstruksi dan analisis pustaka metagenom yang mengekspresikan senyawa bioaktif untuk mengendalikan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [tesis]. Bogor (ID): IPB University.
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M *et al.* 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 25(1):28–36. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>.
- Thongkaewyuan A, Chairin T. 2018. Biological of *Meloidogyne incognita* by *Metarhizium guizhouense* and its protease. *Biological control*. 126:142–146. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.005>.
- Tikhonove VE, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Jansson HB. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*. 35(1): 67–78. DOI: <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1312>.
- Trudgill DL, Blok VC. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review Phytopathology*. 39:53–77. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.53>.
- Uysal G, Sogut MA, Elekcioglu IH. 2017. Identification and distribution of root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) in vegetable growing areas of lake region in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*. 41(1):105–122. DOI: <https://doi.org/10.16970/ted.91225>.
- Wei G, Kloepper JW, Tuzun S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 81(11):1508–1512. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1508>.