

Uji Antagonis *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas berfluorescens* dari Rhizosfer Bambu, Rumput Gajah dan Putri Malu dalam Menekan Bakteri *Ralstonia solanacearum*

Defa Yulia Irfanti *, Yusriadi Marsuni, Elly Liestiany

Prodi Proteksi Tanaman Jurusan HPT Fakultas Pertanian ULM

Corresponden Author:*defadefa473@gmail.com

Received: 04 Januari 2020; Accepted: 11 Januari 2021; Published: 1 Februari 2021

ABSTRACT

Bacterial wilt disease is classified as a disease that is difficult to destroy because it can survive in the soil for a long time with rapid spread through air, agricultural equipment and others. Planning for biological control is the use of antagonistic agents derived from the plant rhizosphere. The aim of this research was to see the bacteria *Bacillus* sp. and *Pseudomonas fluorescens* from the rhizosphere of bamboo, elephant grass and female shame have the ability to inhibit *R. solanacearum* bacteria. The isolates of this pathogen were obtained from tomato plants with bacterial wilt symptoms taken from the Farmer Group's land in Karang Anyar and the bamboo rhizosphere, elephant grass and shy daughter were taken in the Palam area, Guntung Manggis, Banjarbaru. RAL method with 7 treatments (4 replications). The T1 and T2 treatments were significantly different in causing the inhibition zone to *R. solanacearum* of 1.15 mm and 0.64375 mm. The ability of *Pseudomonas* to fluorescence and *Bacillus* sp. of different rhizosphere have inhibitory abilities that are not the same as the inhibition zone is visible faint or thin.

Key words: *Bacillus* sp., *R. solanacearum*, *Rhizosphere*, *Pseudomonas fluorescence*

ABSTRAK

Penyakit layu bakteri tersebut tergolong penyakit yang sulit dimusnahkan karena mampu bertahan hidup di tanah cukup lama dengan penyebaran yang cepat melalui air, peralatan pertanian dan lainnya. Sehingga diperlukan pengendalian hayati berupa penggunaan agens antagonis yang berasal dari rhizosfer tanaman. Penelitian bertujuan untuk mengetahui bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas berfluorescens* dari rhizosfer bambu, rumput gajah dan putri malu memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri *R. solanacearum*. Isolat pathogen ini diperoleh dari tanaman tomat yang bergejala layu bakteri diambil dari lahan Kelompok Tani di Karang Anyar dan rhizosfer bambu, rumput gajah dan putri malu diambil di daerah Palam, Guntung Manggis, Banjarbaru. Metode RAL dengan 7 perlakuan (4 ulangan). Perlakuan T₁ dan T₂ berbeda nyata dalam menimbulkan zona hambat terhadap *R. solanacearum* sebesar 1.15 mm dan 0.64375 mm. Kemampuan *Pseudomonas berfluorescens* dan *Bacillus* sp. dari rhizosfer yang berbeda memiliki kemampuan menghambat yang tidak sama dengan zona hambat terlihat samar atau tipis.

Kata kunci : *Bacillus* sp., *R. solanacearum*, *Rhizosfer*, *Pseudomonas berfluorescens*

Pendahuluan

Bakteri *R. solanacearum* memiliki inang luas (Nasrun *et al.*, 2007) dengan ciri gejala layu meskipun daun masih hijau karena terhambatnya penyebaran air dan nutrisi, apabila pangkal batang dipotong terdapat warna coklat pada pembuluh xylem, dapat hidup tanpa ada inang dan tersebar cepat melalui aliran air tanah serta tanaman mati dalam waktu cepat. Penyakit ini menyebabkan kehilangan hasil, penurunan berat basah dan kering

produk akibat adanya infeksi bakteri patogen (Purnawati *et al.*, 2014).

Pengendalian hayati dilakukan dengan memanfaatkan mikroba di sekitar perakaran (Klopper *et al.*, 1989) seperti *P. fluorescens* dan *Bacillus* sp. yang merupakan bakteri Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), mampu mengkolonisasi perakaran serta berperan sebagai agens antagonis (antibiosis, kompetisi ruang dan kebutuhan nutrisi) (Beneduzi *et al.*, 2012). Bakteri *Bacillus* sp. dan *P. fluorescens* merupakan

bakteri yang sering digunakan sebagai agens hayati yang dapat ditemukan disekitar perakaran

Pada beberapa penelitian diperoleh informasi bahwa dengan menggunakan mikroorganisme dari tanaman bambu, rumput gajah dan putri malu dapat sebagai bakteri antagonis terhadap penyakit tanaman, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas berfluorescens* dari rhizosfer yang berbeda, apakah mampu menekan *R. solanacearum*.

Metode Penelitian

Penelitian ini memakai metode RAL dengan 7 perlakuan dan 4 ulangan sehingga keseluruhan berjumlah 28 cawan petri. Tiap ulangan terdiri atas 2 satuan percobaan, perlakuan tersebut yaitu:

- T₀ : *R. solanacearum*
- T₁ : *R. solanacearum* + *Pseudomonas berfluorescens* bambu
- T₂ : *R. solanacearum* + *Bacillus* sp. bambu
- T₃ : *R. solanacearum* + *Pseudomonas berfluorescens* rumput gajah
- T₄ : *R. solanacearum* + *Bacillus* sp. rumput gajah
- T₅ : *R. solanacearum* + *Pseudomonas berfluorescens* putri malu
- T₆ : *R. solanacearum* + *Bacillus* sp. putri malu

Persiapan penelitian

Persiapan penelitian berupa sterilisasi alat, pembuatan media *Tetrazolium chlorida* (TZC), pembuatan media NA dan pembuatan media King's B.

Pelaksanaan Penelitian

Isolasi *R. solanacearum*

Isolat yang digunakan berasal dari tanaman tomat bergejala. Potong bagian pangkal batang, rendam dengan air steril hingga terlihat ose bakteri. Celupkan jarum ose steril kedalam air ose bakteri lalu goreskan pada media TZC. Inkubasi selama ± 24-48 jam dan murnikan. Pemurnian dilakukan dengan mengambil koloni virulen untuk dipindah pada media TZC baru. Koloni murni *R. solanacearum* diuji lebih lanjut dengan melakukan uji sifat gram bakteri dengan KOH 3% dan menghasilkan gram negatif.

Isolasi *Pseudomonas berfluorescens* dari Rhizosfer Bambu, Rumput Gajah dan Putri Malu

Isolat *Pseudomonas berfluorescens* diambil dari masing-masing rhizosfer ditimbang sebanyak 10 g untuk dilakukan pengenceran hingga 10⁻⁴. Celupkan jarum ose steril dalam suspensi pengenceran 10⁻⁴, jarum tersebut digorekan pada King's B. Inkubasikan (± 24-48 jam) dan murnikan. Pemurnian dilakukan dengan mengambil isolat *Pseudomonas berfluorescens* yang berpendar saat pengamatan menggunakan sinar uv, lalu dipindahkan pada media King's B baru. Koloni murni *Pseudomonas berfluorescens* uji sifat gram bakteri dengan KOH 3% dengan hasil pengujian berupa gram negatif.

Isolasi *Bacillus* sp. dari Rhizosfer Bambu, Rumput Gajah dan Putri Malu

Isolat *Bacillus* sp. diambil dari rhizosfer masing-masing bahan kemudian timbang sebanyak 10 g untuk dilakukan pengenceran sampai 10⁻⁴. Ambil pengenceran 10⁻⁴ suspensi sebanyak 2 ml, panaskan (80 °C) selama 30 menit, ambil sebanyak 5x10⁻² ml sebarkan ke media NA. Inkubasi selama ± 24-48 jam dan murnikan. Pemurnian dilakukan dengan mengambil koloni yang tumbuh, dapat dikatakann *Bacillus* sp. karena telah melalui pemanasaan saat isolasi. Koloni murni *Bacillus* sp. diuji lebih lanjut dengan melakukan uji sifat gram bakteri dengan KOH 3% dengan hasil gram positif.

Uji antagonis terhadap *R. solanacearum*

Pengujian dilakukan dengan mengambil 0,05 ml suspensi *R. solanacearum* pada kerapatan 10⁷CFU/ml (Suryadi, 2009) untuk diinokulasikan pada media NA dengan metode spread. Lubangi bagian tengah media pada cawan petri menggunakan cork borer dengan diameter 5 mm (Surjowardojo *et al.*, 2016). Suspensi *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas berfluorescens* sesuai perlakuan dengan kerapatan 10⁷CFU/ml dimasukkan kedalam sumuran. Amati setiap 12 jam sekali selama 72 jam (Suryadi, 2009).

Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan melihat zona hambat dari pertumbuhan *R. solanacearum* yang terjadi disekitar sumuran. Berdasarkan penelitian Suryadi (2009) zona hambat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Zona hambatan} : \frac{r_1+r_2}{2}$$

Keterangan : dimana r adalah jari-jari pada zona bening

r1 = terpanjang

r2 = terpendek

Analisis Data

Data hasil pengamatan diuji menggunakan uji homogeny ragam Bartlett. Data homogen dilanjutkan dengan analisis ragam (ANOVA) dan uji LSD.

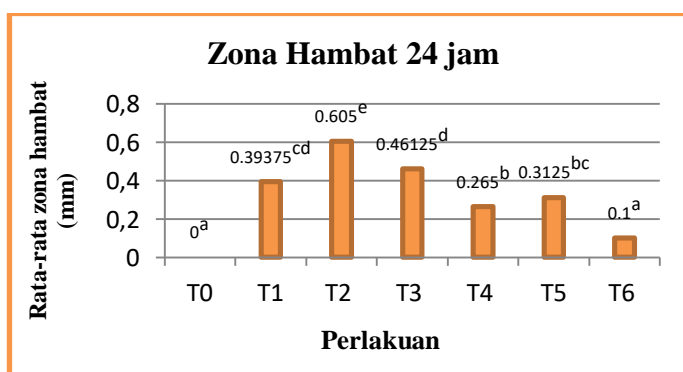
Hasil dan Pembahasan

Hasil uji kehomogen dalam pengujian zona hambat menggunakan uji bartlett adalah homogen, dilanjutkan dengan analisis data (ANOVA) RAL 1 faktor menunjukkan bahwa *Pseudomonas berfluorescens* dan bakteri *Bacillus* sp. tidak signifikan terhadap *R. solanacearum*, hasil data tersebut dilanjutkan pengujian beda nyata jujur (BNJ) taraf 5 % menyatakan bahwa *Pseudomonas berfluorescens* dan bakteri *Bacillus* sp. dari tanaman bambu menghasilkan data yang signifikan terhadap *R. solanacearum*.

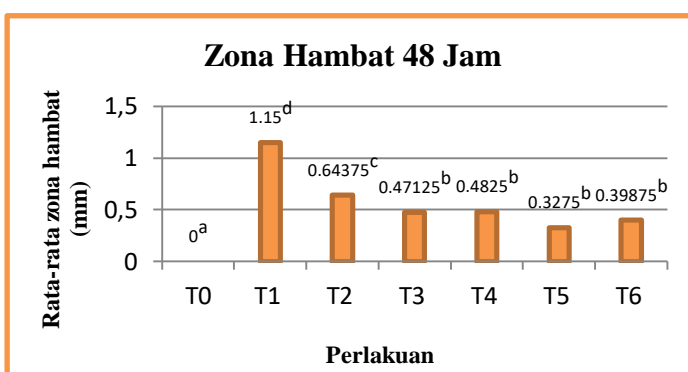
Hasil uji BNJ taraf 5 % pada pengamatan 24 jam (Gambar 1) T₁ sampai T₅ merupakan perlakuan yang signifikan terhadap T₀ dan T₆, yaitu mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* namun zona yang dihasilkan samar. T₃ tidak signifikan dengan T₁, T₄ dan T₅. Pada pengamatan 48 jam dan 72 jam (gambar 2 dan 3) memiliki nilai zona hambat yang sama karena tidak terjadi peningkatan pertumbuhan bakteri agens. perlakuan T₁ tersebut merupakan perlakuan yang signifikan terhadap bakteri *R. solanacearum* yang artinya perlakuan tersebut

mampu menghambat atau menekan bakteri *R. solanacearum* namun tidak terlalu besar zona hambat yang dihasilkan hanya terlihat samar, sedangkan perlakuan T₃ dan T₅ tidak signifikan terhadap bakteri *R. solanacearum* yang artinya perlakuan T₃ dan T₅ tidak dapat menekan atau menghambat bakteri *R. solanacearum*. Hal tersebut diduga karena bambu merupakan tanaman yang memiliki daya tumbuh baik pada berbagai jenis iklim, terdapat mikroorganisme pada rhizosfer maupun perakaran yang dapat mengkoloni perakarannya sehingga tahan terhadap patogen.

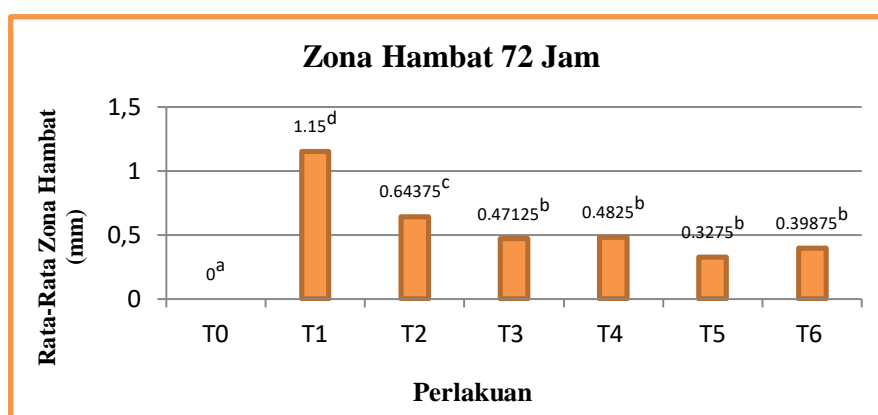
Hasil uji BNJ taraf 5% pada pengamatan 48 jam dan 72 jam (Gambar 2 dan 3) menyatakan bahwa perlakuan T₂ signifikan terhadap bakteri *R. solanacearum* dimana perlakuan tersebut dapat menghambat pertumbuhan ataupun menekan bakteri *R. solanacearum*, sama halnya dengan perlakuan T₁ bahwa zona hambat yang dihasilkan samar-samar. Sedangkan untuk perlakuan T₄ dan T₆ tidak signifikan terhadap bakteri *R. solanacearum* dimana perlakuan tersebut tidak dapat menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri *R. solanacearum*, diduga rhizosfer bambu memiliki banyak mikroorganisme menguntungkan dalam mencegah patogen maupun sebagai pemacu pertumbuhan. Begitu pula dengan bakteri rhizosfer rumput gajah dan putri malu juga digunakan sebagai pemacu pertumbuhan meskipun setiap rhizosfer tanaman terdapat mikroorganisme yang sejenis namun daya hambat yang dimiliki bakteri tersebut berbeda-beda (Butarbutar *et al.*, 2018).



Gambar 1. Zona hambat pengamatan 24 jam



Gambar 2. Zona hambat pengamatan 48 jam



Gambar 3. Zona hambat pengamatan 72 jam

Mikroorganismen memiliki fase pertumbuhan yang berbeda-beda terutama pada media pertumbuhan yang dipengaruhi oleh komposisi media itu sendiri ataupun saat nutrisi media telah menipis (Prastika, 2018). Pada pengamatan 24 jam pertumbuhan bakteri masih sedikit dimana fase tersebut bakteri mulai beradaptasi yang disebut fase lag, kemudian pertumbuhan meningkat (baik bakteri agens antagonis maupun patogen dalam pengujian pertumbuhan) yang disebut fase logaritmik atau eksponensial sehingga pada fase ini dapat terlihat (samar) zona hambat antar agens antagonis dan bakteri patogen. Saat 48 jam, pertumbuhan bakteri masih bertambah namun tidak begitu tampak. Terlihat nilai zona hambat saat 48 jam dan 72 jam tidak mengalami kenaikan hal ini kemungkinan bakteri tersebut sudah berada pada fase stasioner dimana fase tersebut menunjukkan pertumbuhan bakteri tetap atau stabil sehingga nilai pengamatan zona hambat antara 48 jam dan 72 jam sama.

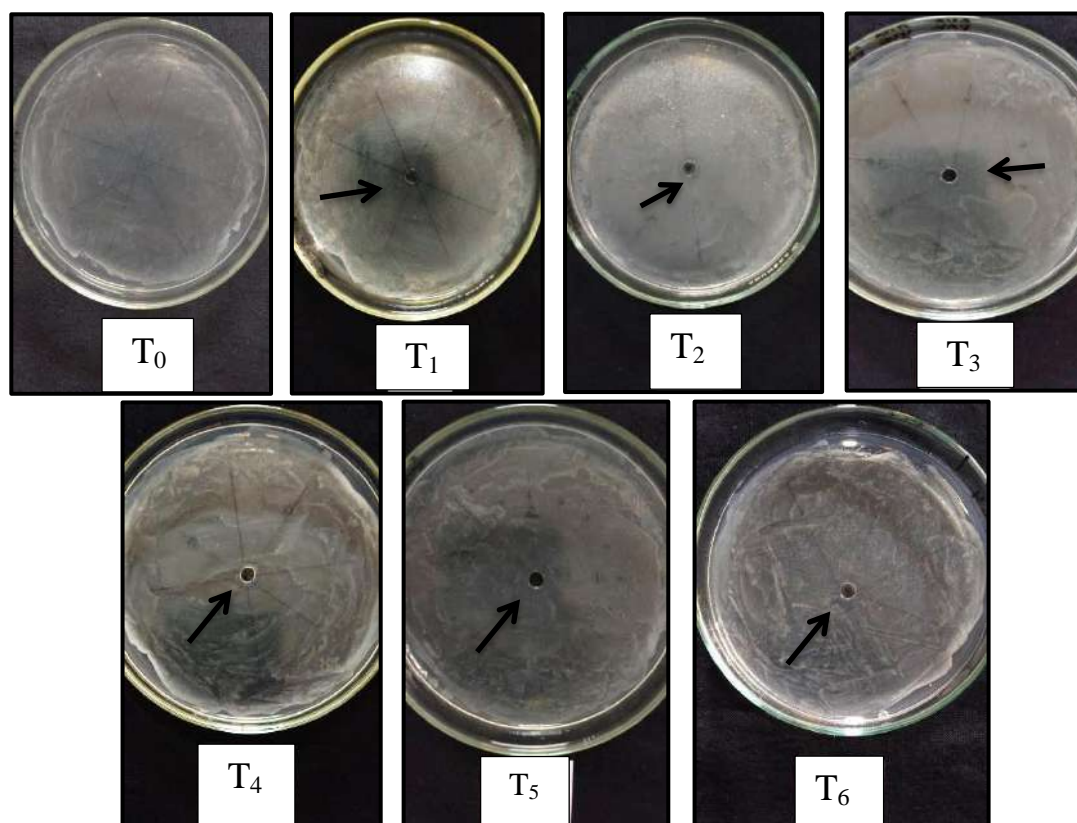
Perlakuan bakteri *R. solanacearum* yang ditambahkan bakteri *Pseudomonas berfluorescens* (T₁, T₃ dan T₅) memperlihatkan adanya zona hambat dalam pertumbuhan bakteri *R. solanacearum* disekitar lubang sumuran, zona hambat yang dihasilkan berupa zona bening yang memberikan jarak antara bakteri agens dengan bakteri patogen (Gambar 4). Zona bening terjadi karena bakteri *Pseudomonas berfluorescens* mampu menghasilkan zat antibiotik melalui metabolit sekunder seperti siderofor, kitinase antibiotik dan sianida sehingga mampu menghambat atau menekan pertumbuhan bakteri patogen (Istiqomah dan Kusumawati, 2018). Pada perlakuan bakteri *R. solanacearum* ditambahkan

bakteri *Bacillus* sp. (T₂, T₄, dan T₆) memperlihatkan adanya zona hambat disekitar lubang sumuran yang menghambat tumbuhnya *R. solanacearum* karena bakteri *Bacillus* sp. dapat mengeluarkan zat antibiotik melalui metabolit sekunder berupa surfactin, fengisin, iturin dan subtilisin A (Nagorska *et al.*, 2007). Namun samar-samar hambatan yang dihasilkan bakteri *Pseudomonas berfluorescens* dan bakteri *Bacillus* sp..

Tiap perlakuan mampu menghambat bakteri *R. solanacearum* namun perlakuan yang paling baik adalah perlakuan yang berasal dari rhizosfer bambu (T₁ dan T₂) memberikan hasil yang signifikan dengan zona hambat yang sangat kecil / tipis / samar. Kecilnya nilai zona hambat yang dihasilkan diduga karena setiap rhizosfer memiliki tingkat kelembaban, suhu maupun pH tanah yang berbeda sebagai tempat kehidupan mikroorganismen dan tiap isolatnya menghasilkan senyawa antibiosis atau zat penghambat yang beragam sesuai dengan pernyataan Soesanto (2008) bahwa mikroba antagonis memiliki mekanisme penghambatan yang tidak sama antara satu dengan lainnya baik itu mikroba dari bahan organik maupun rhizosfer. Hasil penelitian Sukmawati (2013) menyatakan bahwa isolat BT5 (*Pseudomonas*) dari rhizosfer bambu menghasilkan daya hambat terbaik dibandingkan isolat lainnya terhadap pertumbuhan *R. solanacearum* dengan diameter lebih dari 3 cm dan terhadap pertumbuhan *Fusarium oxysporum* sebesar 80,68% secara *in vitro* serta bersifat antagonis dengan memproduksi toksin ataupun metabolit sekunder dalam menghambat patogen.

Menurut Ilyas (2001) dalam Walida *et al.* (2018) faktor yang berpengaruh terhadap

pertumbuhan bakteri yaitu lingkungan (biotik dan abiotik), makanan (media tumbuh) dan suhu



Gambar 4. (T₀) Perlakuan kontrol, (T₁) Perlakuan Rs + Pf bambu, (T₂) Perlakuan Rs + Bc bambu, (T₃) Perlakuan Rs + Pf rumput gajah, (T₄) Perlakuan Rs + Bc rumput gajah, (T₅) Perlakuan Rs + Pf putri malu, (T₆) Perlakuan Rs + Bc putri malu

(minimum, optimum dan maksimum). Kecilnya zona hambat dapat pula disebabkan oleh komposisi media yang digunakan. Media yang kaya nutrisi akan menjadikan agens tersebut tidak maksimal dalam penghambatan yang mempengaruhi munculnya senyawa antibiotik agens antagonis karena agens antagonis tidak dapat menghambat pada suatu media mungkin dapat menghambat pada jenis media lainnya (Nawangsih, 2006). Berdasarkan penelitian Moore *et al.* (2013) menerangkan bahwa 3 media (NZY agar, NA dan TSA) tidak menimbulkan zona hambat dari 4 media yang digunakan diduga kondisi dan komposisi media yang dipakai sehingga bakteri agens tidak mengeluarkan senyawa antibiosis dalam menghambat patogen.

Dalam hal ini bukan berarti agens antagonis tidak mampu menghambat secara *in vitro* namun mungkin bisa saja menghambat secara *in vivo* sesuai penelitian Hersanti *et al.* (2009)

memperlihatkan bahwa penyakit layu bakteri pada tanaman kentang dapat dikendalikan dengan bakteri *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* dan *Trichoderma harzianum* secara *in vivo* tetapi menurut Supriadi (2011) pengaruh keberhasilannya masih berubah-ubah karena lemahnya teknologi pemulsi.

Kesimpulan

Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas berfluorescens* dari masing-masing rhizosfer dapat menekan bakteri *R. solanacearum* dengan zona hambat yang sangat kecil (tidak signifikan), tetapi perlakuan T₁ dan T₂ adalah perlakuan yang signifikan dalam menekan bakteri *R. solanacearum* dibandingkan perlakuan lainnya.

Daftar Pustaka

Butarbutar, R., Marwan, H., Mulyati, S. 2018. Eksplorasi *Bacillus* spp. dari rizosfer

- tanaman karet (*Hevea Brasilliensis*) dan potensinya sebagai agens hayati jamur akar putih (*Rigidoporus* sp.). *Jurnal Agroecotania*, 1(2): 31-41.
- Beneduzi, A., Amborsini, A and Passaglia, L. M. P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 1044–1051.
- Hersanti, Rupendi, R. T., Purnama, A., Hanudin, Marwoto, B. dan Gunawan, O. S. 2009. Penapisan beberapa isolat *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* dan *Trichoderma harzianum* yang bersifat antagonistik terhadap *Ralstonia solanacearum* pada tanaman kentang. *Jurnal Agrikultura*, 20(3): 198-2003.
- Ilyas, S. 2001. Mikrobiologi Dasar. Diklat Kompilasi. Universitas Sumatera Utara Press. Medan. Dalam Walida, H., Siregar, A. A. dan Prawanda, A. 2018. Isolasi bakteri dari rendaman akar bambu dan respon pemberiannya terhadap pertumbuhan dan produksi tanaman terung ungu (*Solanum melongena* L.). *Jurnal Agroplasma (STIPER) Labuhanbatu*, 5(1): 1-9.
- Istiqomah dan Kusumawati, D. E. 2018. Pemanfaatan *Bacillus subtilis* Dan *Pseudomonas fluorescens* dalam pengendalian hayati *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri pada tomat. *Jurnal Agro*, 5(1): 1–12.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and Zablotowicz, R. M. 1989. Freelifing bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol.*, 7(2): 39–43.
- Nagorska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M. 2007. Multicellular behaviour and production of wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54: 495–508.
- Nasrun, Christanti, Arwiyanto, T dan Ika, M. 2007. Karakteristik fisiologis *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri nilam. *Jurnal Litri*, 13(2): 43-48.
- Nawangsih, A. A. 2006. Seleksi dan karakteristik bakteri biokontrol untuk mengendalikan penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tomat. *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V. and Sorokulova, I. 2013. Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against food-borne pathogens. *Journal of Probbiotics & Health*. 1(3): 110.
- Purnawati, A., Sastrahidayat, I. R., Abadi, A. L. dan Hadiastono, T. 2014. Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. *The Journal of Tropical Life Science*, 4(1): 33-36.
- Prastika, E. Z. 2018. Pengaruh konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Soesanto, L. 2008. Pengantar pengendalian hayati penyakit tanaman. In PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. p. 574.
- Sukmawati, S. 2013. Keragaman bakteri dari beberapa jenis rizosfer dan bahan organik serta efektifitasnya terhadap patogen penyebab penyakit layu pada kentang secara *In Vitro*. *Tesis*. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Supriadi. 2011. Penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*): Dampak, bioekologi dan peranan teknologi pengendaliannya. *Jurnal Pengembangan Inovasi Pertanian*, 4(4): 279-293.
- Surjowardojo, P., Tri, E. S dan Vasco, B. 2016. Daya hambat dekok kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan

Streptococcus agalactiae penyebab mastitis pada sapi perah. *Jurnal Ternak Tropika*, 7(1): 11-21.

Suryadi, Y. 2009. Efektivitas *Pseudomonas fluorescens* terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia Solanacearum*) pada tanaman kacang tanah. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen). *Jurnal HPT Tropika*., 9(2): 174-180.