

**PENGENDALIAN HAYATI PENYAKIT LAYU BAKTERI TEMBAKAU :  
1. ISOLASI BAKTERI ANTAGONIS\***

**(BIOLOGICAL CONTROL OF TOBACCO BACTERIAL WILT :  
1. ISOLATION OF ANTAGONISTIC BACTERIA)\***

Triwidodo Arwiyanto  
Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

**INTISARI**

Sebanyak 300 strain pseudomonad fluoresen dan 120 strain *Bacillus* spp. diisolasi dari rizosfer putri malu (*Mimosa invisa* L.). Isolasi dilakukan pada medium King's B untuk pseudomonad fluoresen dan pada medium Tryptic Soy Agar untuk *Bacillus* spp. Pada masing-masing medium ditambahkan 100 ppm sikloheksimid untuk mencegah pertumbuhan jamur. Semua strain yang diperoleh diuji kemampuannya menghambat pertumbuhan *Pseudomonas solanacearum* secara *in vitro*. Sebagian besar pseudomonad fluoresen mampu menghambat dengan zona penghambatan antara 1 - 16 mm. Mekanisme penghambatan adalah bakteriostatik dan beberapa di antaranya bakterisida. Sebanyak 66 strain *Bacillus* spp. menghambat pertumbuhan *P. solanacearum* dengan diameter penghambatan 2 sampai 14 mm dengan mekanisme bakterisida. Di antara kedua marga bakteri antagonis tersebut diperoleh beberapa strain yang tidak saling menghambat satu dengan yang lain tetapi masih menghambat pertumbuhan *P. solanacearum*.

Kata kunci: *P. solanacearum*, tembakau, bakteri antagonis, rizosfer

**ABSTRACT**

Three hundred strains of fluorescent pseudomonad and 120 strains of *Bacillus* spp. were isolated from the rhizosphere of *Mimosa invisa* L. Fluorescent pseudomonad was isolated on King's B while *Bacillus* spp. were isolated on Tryptic Soy Agar medium. Each media were supplemented with 100 ppm cycloheximide to suppress fungal growth. All isolated strains were tested for their capability to suppress the growth of *Pseudomonas solanacearum* on appropriate media. Most of fluorescent pseudomonad inhibited the growth of the pathogen with an inhibition zone from 1mm to 16 mm. The mechanism of growth-inhibition was bacteriostatic and some of them were bactericidal. Sixty six out of 120 strains of *Bacillus* spp. produced defined inhibition zones on the media. The zone of growth-inhibition varied from 2 to 14 mm and the mechanism of inhibition was bactericidal. Several strains of those two bacterial marga exhibited non-antagonistic activity toward each other.

Key-words : *P. solanacearum*, tobacco, antagonistic-bacteria, rhizosphere

**PENGANTAR**

Tembakau cerutu yang diusahakan oleh PTPN-II Sumatera Utara merupakan bahan

pembalut cerutu nomor satu di dunia. Meskipun demikian, produksi tembakau selama dasawarsa ini menurun tajam sehingga tidak dapat memenuhi kebutuhan

---

\* Sebagian dari hasil penelitian yang dibiayai lewat proyek RUT-IV dengan nomor kontrak 85/SP/RUT/BPPT/IV/97

pasar. Salah satu faktor menurunnya produksi tersebut adalah adanya penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Pseudomonas solanacearum* (Hartana, 1978). Di beberapa kebun penyakit ini menyebabkan kematian tanaman sampai 50%. Sampai sekarang penyakit ini dikendalikan dengan cara sanitasi dan rotasi dengan tebu diikuti dengan *Mimosa invisa*. Cara pengendalian seperti ini terbukti tidak efektif menekan penyakit layu di lapangan. Mengingat komoditas ini selain bernilai ekonomis tinggi juga bernilai historis maka sangat perlu dicarikan cara-cara pengendalian yang efektif dan berwawasan lingkungan.

Setelah tembakau, lahan diolah kemudian ditanami tebu selama tiga tahun. Setelah ratoon kedua, putri malu (*Mimosa invisa*, L.) ditanam selama enam bulan. Penanaman putri malu ini ternyata dapat menaikkan kandungan bahan organik tanah dan kadar nitrogen dalam tanah (Erwin, 1997, komunikasi pribadi). Di samping itu, rotasi tanaman ini akan mengubah komposisi mikroorganisme dalam tanah yang di antaranya dapat bersifat antagonis terhadap patogen (Cook dan Baker, 1983). Hartana (1978) telah lama menduga bahwa di rizosfer putri malu mungkin terdapat mikroorganisme yang bersifat antagonis terhadap *P. solanacearum*. Meskipun demikian sampai laporan ini ditulis belum pernah dibuktikan secara ilmiah kebenaran pernyataan tersebut di atas. Mengingat bahwa mikroorganisme rizosfer yang bersifat antagonis terhadap patogen tumbuhan sangat potensial dikembangkan sebagai agens pengendali hayati maka penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan salah satu cara pengendalian dan juga menjawab secara ilmiah pernyataan dari para ahli tersebut di atas.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari rizosfer putri malu berhasil diisolasi sejumlah strain bakteri dari dua marga yang

bersifat antagonis terhadap patogen layu bakteri tembakau (*P. solanacearum*).

## BAHAN DAN METODE

### Contoh tanaman

Perakaran putri malu diambil dari tanaman di area perkebunan tembakau milik PTPN-II, Sumatera Utara. Perakaran beserta tanah disekitarnya dimasukkan ke dalam kantong plastik dan disimpan dalam termos es. Contoh tersebut segera dibawa ke Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan Fakultas Pertanian UGM untuk diisolasi mikroorganisme yang bersifat antagonis terhadap *P. solanacearum*, penyebab penyakit layu bakteri tembakau.

### Isolasi pseudomonad fluoresen

Sebanyak 10 gram tanah rizosfer beserta akar putri malu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml 0,1M bufer fosfat pH 7,0 + 0,1% pepton. Erlenmeyer tersebut kemudian digojok selama 30 menit. Setelah penggojokan, didiamkan selama 10 menit kemudian dilakukan seri pengenceran per sepuluh kali dengan bufer yang sama. Pada pengenceran ke- $10^3$  dan  $10^4$  diambil 0,1 ml kemudian ditumbuhkan pada medium King's B + 100 ppm sikloheksimid. Setelah masa inkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}$  C, koloni tunggal yang berpendar diambil dengan tusuk gigi steril dan ditumbuhkan pada cawan Petri berisi medium yang sama tanpa sikloheksimid sebanyak 10 strain per cawan Petri. Bakteri kemudian diinkubasikan lagi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}$  C.

### Isolasi *Bacillus* spp.

Sebanyak 10 gram tanah rizosfer beserta akar putri malu dikeringanginkan selama lima hari pada suhu kamar kemudian dipanaskan dalam oven pengering pada suhu  $80^{\circ}$  C

selama satu jam. Setelah dingin, sampel tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml 0,1M bufer fosfat pH 7,0 + 0,1% pepton. Erlenmeyer tersebut kemudian digojok selama 30 menit. Setelah penggojokan, didiamkan selama 10 menit kemudian dilakukan seri pengenceran per sepuluh kali dengan bufer yang sama. Pada pengenceran ke- $10^3$  dan  $10^4$  diambil 0,1 ml kemudian ditumbuhkan pada medium Tryptic Soy Agar + 100 ppm sikloheksimid. Setelah masa inkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$ , koloni tunggal yang tumbuh diuji sifat Gram-nya dengan KOH 3%. Koloni bakteri Gram positif ditumbuhkan pada cawan Petri berisi medium yang sama tanpa sikloheksimid sebanyak 10 strain per cawan Petri. Bakteri kemudian diinkubasikan lagi selama 24 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$ .

#### Uji antagonisme secara *in vitro*

Pseudomonad fluoresen ditumbuhkan pada cawan Petri berisi medium King's B (Difco) sebanyak tiga strain per cawan Petri. *Bacillus* spp. ditumbuhkan pada cawan Petri berisi medium Tryptic Soy Agar (Difco) sebanyak tiga strain per cawan Petri. Setelah masa inkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$  cawan Petri dibalik dan pada tutupnya dituangi dengan 1 ml kloroform. Dua jam kemudian cawan Petri dibalik kembali pada posisi semula. Pada permukaan medium tersebut dituangkan suspensi *P. solanacearum* (0,2 ml suspensi air steril *P. solanacearum* dalam 4 ml 0,6% agar air pada suhu  $45^\circ\text{C}$ ). Biakan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$  kemudian zona hambatan yang terbentuk diukur. Strain yang mampu menghambat diuji sebanyak dua kali lagi dengan medium dan metode yang sama. Strain-strain yang konsisten menghambat pertumbuhan *P. solanacearum* secara *in vitro* kemudian disimpan.

#### Deteksi mekanisme penghambatan

Agar yang berada dalam zona hambatan diambil secara aseptis dengan skalpel steril. Agar tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 1% air pepton dan dihancurkan dengan jarum preparat. Air pepton berisi agar kemudian digojok selama 24 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Air pepton yang menjadi keruh setelah 24 jam menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang kemudian dikonfirmasi dengan menumbuhkannya pada cawan Petri berisi media yang sesuai. Air pepton yang tidak menjadi keruh terus digojok sampai lima hari kemudian.

#### Deteksi antagonisme antar antagonis

Baik pseudomonad fluoresen maupun *Bacillus* spp. yang bersifat antagonis terhadap *P. solanacearum* yang diperoleh, akan digunakan sebagai agens pengendali hayati penyakit layu yang ditimbulkan oleh patogen tersebut. Dengan demikian strain-strain dari kedua marga bakteri tersebut harus tidak saling menghambat. Untuk menseleksi bakteri antagonis yang tidak saling menghambat maka dilakukan percobaan sebagai berikut. Bakteri pseudomonad fluoresen yang bersifat antagonis terhadap *P. solanacearum* ditumbuhkan pada medium King's B dalam cawan Petri sebanyak tiga strain per cawan Petri. *Bacillus* spp. antagonis ditumbuhkan pada medium Tryptic Soy Agar dalam cawan Petri sebanyak tiga strain per cawan Petri. Setelah masa inkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$  cawan Petri dibalik dan pada tutupnya dituang satu mililiter kloroform. Dua jam kemudian cawan Petri dibalik kembali dan pada permukaan medium dituangi suspensi bakteri antagonis yang lain. Sebagai pembanding positif dituangi dengan suspensi *P. solanacearum*. Adanya zona hambatan yang terbentuk menunjukkan bahwa antara kedua bakteri tersebut terjadi antagonisme.

Percobaan diulang dua kali lagi dengan metode yang sama. Strain-strain yang tidak saling menghambat kemudian disimpan pada agar miring, dan pada agar tegak yang ditutup dengan parafin cair steril. Biakan pada agar miring disimpan di kulkas dan di suhu kamar sedangkan yang ditutup dengan parafin cair steril disimpan pada suhu kamar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pseudomonad yang termasuk dalam kelompok fluoresen merupakan bakteri pengkoloni akar yang agresif dan efektif (Bolton *et al.*, 1993). Hal ini mungkin disebabkan kebutuhan nutrisinya yang gampang (*nutritionally versatile*) karena mampu menggunakan berbagai macam sumber karbon (Palleroni, 1984). Faktor lain yang mendukung sifat mengkoloninya (*colonizer*) adalah kemampuannya membentuk berbagai senyawa penghambat pertumbuhan seperti HCN, monoacetylphloroglucinol, siderofor, 2,4-diacetylphloroglucinol, puoluterin, asam salisilat (Defago *et al.*, 1990), pyrrolnitrin, altericidins, dan cepacin (Homma *et al.*, 1989). Dengan kemampuannya membentuk senyawa tersebut, kelompok bakteri ini mampu berkompetisi mendapatkan nutrisi dan ruang dengan menyisihkan bakteri atau mikroorganisme kompetitor. Telah banyak dilaporkan bahwa bakteri rizosfer yang termasuk dalam kelompok pseudomonad fluoresen dapat menekan pertumbuhan patogen tumbuhan baik jamur maupun bakteri (Fukui *et al.*, 1994; Trigalet *et al.*, 1994). Di samping efek langsung penekanan terhadap patogen, bakteri dalam kelompok ini ada juga yang menghasilkan zat tumbuh atau mengimbas tanaman sehingga tahan terhadap patogen tertentu (Tuzun dan Ku, 1991; van Peer *et al.*, 1991). Koloni bakteri yang mudah dikenali dan cepat tumbuh

dalam waktu singkat pada media buatan sederhana menjadikan kelompok bakteri ini banyak diteliti oleh para ahli.

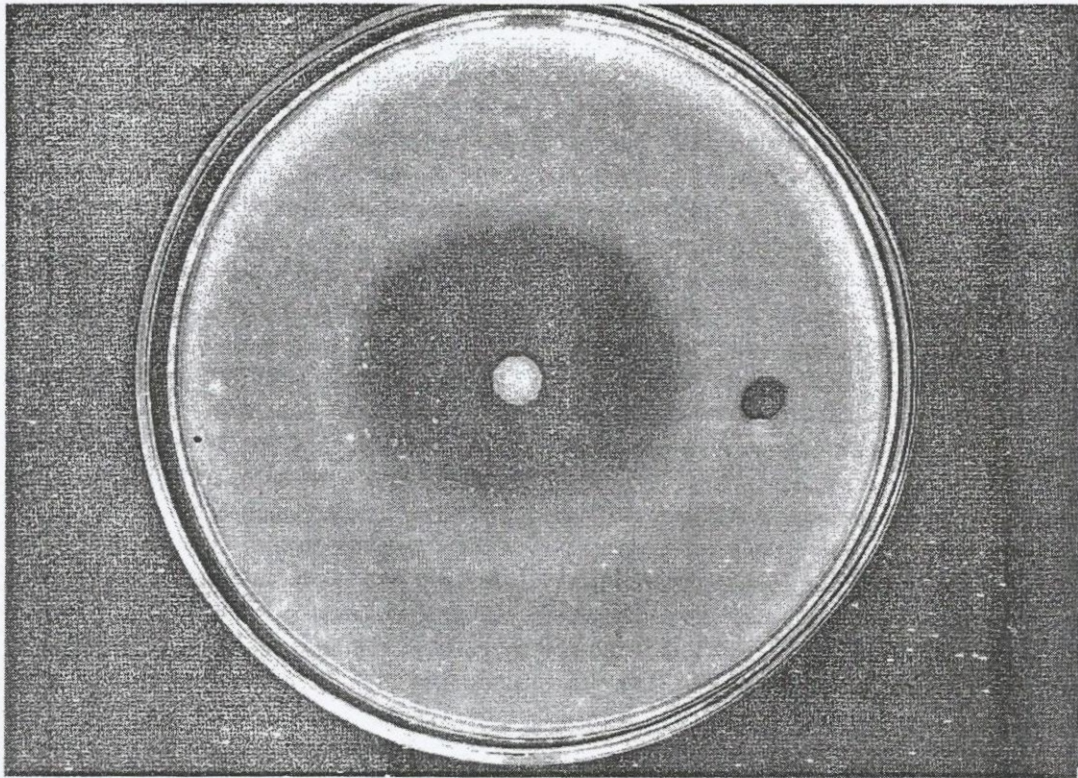
Pengendalian hayati bersifat spesifik lokal, artinya mikroorganisme yang digunakan sebagai antagonis di suatu daerah tertentu hanya akan memberikan hasil yang baik di daerah tersebut (Cook dan Baker, 1993) meskipun ada perkecualian seperti pengendalian nyali mahkota (*crown gall*) oleh *Agrobacterium radiobacter* strain K-84 yang efektif di berbagai tempat (Moore dan Warren, 1979). Dengan demikian untuk mendapatkan mikroorganisme antagonis terhadap *P. solanacearum*, patogen layu bakteri tembakau, isolasi dilakukan pada rizosfer tanaman rotasi di daerah setempat.

Penanaman *M. invisa* selama enam bulan setelah tanaman tebu, sudah lama dipraktekkan oleh PTPN-II dalam mengelola penyakit layu bakteri. Tujuan utamanya adalah memutus daur hidup *P. solanacearum*, di samping mengembalikan bahan organik tanah. Dalam kaitannya dengan pemutusan daur hidup ini, kemungkinan *M. invisa* memelihara sejumlah mikroorganisme di rizosfernya yang di antaranya bersifat antagonis terhadap *P. solanacearum*. Sebanyak 300 strain pseudomonad fluoresen berhasil diisolasi dari rizosfer *M. invisa*. Koloni bakteri berbentuk bulat, bertepi rata dan berpendar hijau kekuningan. Beberapa strain menunjukkan pertumbuhan rizoid. Bakteri bersifat Gram negatif, katalase positif dan oksidase positif. Tidak semua bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan *P. solanacearum* secara *in vitro*. Dua ratus duapuluh strain di antaranya mampu menghambat dengan zona penghambatan bervariasi dari 2 mm sampai 15 mm (Gambar 1). Mekanisme penghambatan sebagian besar adalah bakterisida dan hanya beberapa yang bersifat bakteristatik (Tabel 1). Penghambatan

bakteriostatik ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri dari zona hambatan yang terbentuk (lihat Bahan dan Metode).

Kelompok bakteri rizosfer lain yang bersifat antagonis terhadap *P. solanacearum* adalah *Bacillus* spp. Bakteri ini mempunyai keunggulan di antaranya mampu membentuk spora yang tahan panas, yang nantinya

bermanfaat dalam proses formulasi, membentuk berbagai senyawa penghambat dan mudah dibiakkan (Claus dan Berkeley, 1984). Bakteri dari kelompok ini terbukti bersifat antagonis terhadap berbagai patogen tumbuhan (Broadbent *et al.*, 1977; Silo-Suh *et al.*, 1994; Osburn *et al.*, 1995).



Gambar 1. Penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas solanacearum* oleh pseudomonad fluoresen.

Tabel 1. Zona hambatan pertumbuhan *P. solanacearum* oleh pseudomonad fluoresen (mm)

Zona hambatan (mm)	Jumlah pseudomonad fluoresen yang menghambat	Mekanisme penghambatan
< 5	14	bakteriostatik/bakterisida
5-10	125	bakteriostatik/bakterisida
>10-15	69	bakteriostatik/bakterisida
> 15	12	bakteriostatik/bakterisida
Jumlah strain	220	bakteriostatik/bakterisida

Koloni *Bacillus* spp. ditandai dengan sifat Gram positif, koloni berbentuk bulat, bertepi rata dan berlendir, tembus cahaya. Koloni bakteri ini tumbuh setelah perlakuan pengeringan dengan udara dilanjutkan dengan pengeringan dengan oven pemanas (80°C) selama 30 menit. Dari 122 strain yang

diperoleh, sebanyak 66 strain mampu menghambat pertumbuhan *P. solanacearum* secara *in vitro* (Tabel 2). Mekanisme penghambatan adalah pembentukan bakterisida dan tidak ada satupun yang bersifat bakteriostatik. Zona hambatan yang terbentuk bervariasi dari 1 mm sampai 12 mm.

Tabel 2. Zona hambatan pertumbuhan *P. solanacearum* oleh *Bacillus* spp. (mm)

Zona hambatan (mm)	Jumlah strain <i>Bacillus</i> spp. yang menghambat	Mekanisme penghambatan
< 5	44	bakterisida
5-10	18	bakterisida
>10-15	4	bakterisida
>15	-	bakterisida
Jumlah strain	66	bakterisida

Bakteri antagonis tersebut di atas, diperoleh dengan metode yang didasarkan pada antibiosis di laboratorium sehingga hanya bakteri yang mampu mengeluarkan senyawa penghambat pertumbuhan saja yang dapat dideteksi. Cara ini meniadakan kemungkinan diperolehnya bakteri antagonis yang bersifat kompetitif maupun hiperparasitisme. Di samping itu banyak dilaporkan bahwa tidak selalu ada korelasi positif antara penghambatan di laboratorium dengan penekanan penyakit di rumah kaca dan di lapangan (Cook dan Baker, 1983). Meskipun demikian cara ini merupakan cara yang paling mudah, murah dan cepat untuk menseleksi ratusan bahkan ribuan strain bakteri. Terbukti pula bahwa banyak bakteri agens pengendali hayati yang berhasil dikembangkan, diperoleh dengan metode 'antibiosis' (Fravel dan Larkin, 1996).

Di antara strain-strain dari kedua marga bakteri antagonis yang berhasil diisolasi diperoleh beberapa strain yang tidak saling menghambat. Strain-strain ini apabila dikombinasikan dengan strain avirulen penghasil bakteriosin (Arwiyanto dkk., 1996) merupakan calon agensia pengendali hayati

yang diharapkan dapat bekerja sama menekan penyakit layu bakteri.

Pengendalian secara hayati merupakan salah satu komponen pengendalian penyakit secara terpadu (Semangun, 1995). Dengan kombinasi yang kompatibel dengan cara-cara pengendalian yang lain (Arwiyanto, 1995) maka penyakit layu tembakau diharapkan dapat ditekan seperti halnya penyakit layu bakteri kentang (French, 1992).

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Vera Diany dan Joke J. Risamena atas bantuan teknisnya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Arwiyanto, T. 1995. Strategi Pengendalian Penyakit Layu Bakteri Tembakau Cerutu di Sumatera Secara Terpadu. Makalah disampaikan pada Ekspose Hasil Penelitian Tembakau 1995. Medan. 34 hlm.
- Arwiyanto, T., Sudarmadi dan I. Hartana. 1996. Deteksi strain *Pseudomonas solanacearum* penghasil bakteriosin. *Jurnal Perlindungan tanaman Indonesia* 2: 60-65

- Broadbent, P., K.F. Baker, N. Franks and J. Holland. 1977. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. *Phytopathology* 67: 1027-1034
- Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1984. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. p. 1105-1139. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair and M.E. Sharpe (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The APS Press. St. Paul, Minnesota. 539 pp.
- Defago, G.; C.H. Berling; U. Burger; D. Haas; G. Kahr; C. Keel; C. Voistard; P. Wirthner; and B. Wurthrich. 1990. Suppression of Black Root rot of Tobacco and other Root Diseases by Strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential Applications and Mechanisms. pp. 75-81. In: D. Homby (ed.). *Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens*. CAB International. Wallingford, UK.
- Fravel, D.R. and R.P. Larkin. 1996. Availability and Application of Biocontrol Products. *Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases* 11:1-7
- French, E.R. 1994. Strategies for Integrated Control of Bacterial Wilt of Potatoes. pp.179-198. In: Hayward, A.C. and G.L. Hartman (eds.) *Bacterial Wilt, The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International UK.
- Fukui, R., M.N. Schroth, M. Hendson and J.G. Hancock. 1994. Interaction between strains of pseudomonads in sugar beet spermosphere and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. *Phytopathology* 84:1322-1330
- Hartana, I. 1978. *Budidaya tembakau cerutu I. Masa pra-Panen*. Balai Penelitian Perkebunan Jember. 107 hlm.
- Homma, Y.; Z. Sato; F. Hirayama; K. Kohno; H. Shirahama and T. Suzui. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21: 723-728
- Osburn, R.M., J.L. Miller, E.S. Oplinger, R.S. Smith and J. Handelsman, J. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. *Plant Dis.* 79:551-556
- Moore, L.W. and G. Warren. 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annu. Rev. Phytopathol.* 17:163-179
- Palleroni, N.J. 1984. Pseudomonad. p. 141-199. In: N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Semangun, H. 1995. Konsep dan Asas Dasar Pengelolaan Penyakit Tumbuhan Terpadu. *Risalah Konggres Nasional XII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia. 1-24
- Silo-Suh, L.A., B.J. Lethbridge, S.J. Raffel, H. He, J. Clardy and J. Handelsman. 1994. Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. and Environ. Microbiol.* 60:2023-2030
- Trigalet, A., P. Frey and D. Trigalet-Demery. 1994. Biological Control of Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: State of the Art and Understanding. p. 225-233. In: *Bacterial Wilt. The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK
- Tuzun, S. and Ku, J. 1991. Plant immunization: An alternative to pesticides for control of plant diseases in the greenhouse and field. *FFTC Book Series*:30-40
- van Peer, R., G.J. Niemann and B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS4175. *Phytopathology* 81: 728-734.