



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

ABSTRACT

ARI SUSILOWATI. Physiology and Genetic Characterization of *Pseudomonas* sp. for Biocontrol of Soilborne Fungal Pathogen in Soybean Plant. Under direction of ARIS TRI WAHYUDI, ANTONIUS SUWANTO, SURYO WIYONO and YULIN LESTARI.



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Antagonist bacteria have been recognized playing important role in plant disease suppression. In Indonesia, the role and potential indigenous soybeans' rhizobacteria such as antagonist *Pseudomonas* sp. as biocontrol have not many been reported. The aims of this study were to screen and characterize a number of *Pseudomonas* isolates as biocontrol agent against soilborne fungal pathogens i.e. *Alternaria rolfsii*, *Fusarium oxysporum* or *Rhizoctonia solani* in soybean plants. Seven isolates of *Pseudomonas* sp. CRB showed strong inhibition on the growth of the soilborne pathogenic fungi *in vitro*. Among of them, 7 isolates produced cellulolytic activity, 2 isolates produced chitinase, and 4 isolates produced hydrogen cyanide. Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) indicated high genetic diversity level since 7 ribotype groups were presented. 16S rRNA based phylogenetic tree formed four clusters. There was a quite overlap among ARDRA groups and 16S rRNA clusters, suggested that in the same ARDRA group they were closely related to each other. The sequences of 16S rRNA gene confirmed that the isolates belonging to *Pseudomonas* sp. and similarity percentage varied to various species of *Pseudomonas* showed their extensive diversity. Part of antifungal biosynthesis gene encoding phenazine, *phzF*, phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase could be detected and confirmed in *Pseudomonas* sp. CRB-80 and CRB-102. Seed coating with the *Pseudomonas* sp. CRB demonstrated disease suppression *in planta* at approximately 14-100% in sterile soil and 5-53% in non-sterile soil. *Pseudomonas* sp. CRB-16, CRB-44, CRB-86, CRB-102 and CRB-109 which maintained moderate disease suppression, more than 30% in non-sterile soil might be considered for development as biological control agents to protect soybean from the soilborne fungal disease. Population density in soybean rhizosphere of *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80 and CRB-102 Rif^r were 10²-10⁷ cells/g fresh root weight in sterile soil, in contrast to 10⁰-10⁶ cells/g fresh root weight in non-sterile soil for 6 weeks observation.

Key words: *Pseudomonas* sp., biocontrol, soybean, genetic diversity, antifungal genes.



RINGKASAN

ARI SUSILOWATI. Karakterisasi Fisiologi dan Genetik *Pseudomonas* sp. sebagai Biokontrol Penyakit Cendawan Tular Tanah pada Tanaman Kedelai. Dibimbing oleh ARIS TRI WAHYUDI, ANTONIUS SUWANTO, SURYO WIYONO dan YULIN LESTARI.

Proteksi tanaman modern sangat bergantung pada penggunaan bahan kimia untuk mengatasi hama dan penyakit. Akan tetapi, meningkatnya perhatian terhadap kesehatan dan kerusakan lingkungan yang disebabkan oleh penggunaan bahan kimia untuk pertanian menyebabkan peningkatan tuntutan yang lebih besar terhadap pertanian yang berkelanjutan. Pada tanah yang menekan penyakit dan kompos, penekanan penyakit diperoleh tanpa penggunaan bahan kimia. Penekanan penyakit selalu berhubungan dengan keberadaan bakteri antagonis yang jumlahnya semakin meningkat di dalam tanah. Bakteri rizosfer antagonis yang bermanfaat ini dapat dikembangkan sebagai agen pengendali biologi untuk mengurangi penggunaan bahan kimia di bidang pertanian. Di Indonesia, bakteri antagonis asli rizosfer tanaman kedelai belum banyak dilaporkan dan potensinya sebagai agen biokontrol perlu diteliti lebih lanjut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kandidat agen biokontrol terhadap cendawan patogen tular tanah *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* atau *Rhizoctonia solani* untuk tanaman kedelai.

Delapan puluh satu isolat bakteri rizosfer tanaman kedelai digunakan dalam penelitian ini. Cendawan patogen tular tanah *S. rolfsii*, *F. oxysporum* diperoleh dari Departemen Proteksi Tanaman, IPB. dan *R. solani* diperoleh dari Balai Penelitian Tanah Bogor. Bakteri *Pseudomonas chlororaphis* DF190 dan DF202 (Prof. Dr. Dilantha Fernando, *University of Manitoba*, Kanada); *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, *Pseudomonas fluorescens* Q2-87, Q8-R1 dan *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Dr. Linda Thomashow, *Agricultural Research Service - United States Department of Agriculture (ARS-USDA)*, *Washington State University*, Amerika Serikat) disertakan dalam penelitian ini sebagai bakteri kontrol positif deteksi gen-gen anticendawan.

Uji antagonisme dilakukan dengan menggunakan metode kultur ganda. Besarnya persentase penghambatan pertumbuhan radial cendawan oleh bakteri dihitung menggunakan rumus $1-(a/b) \times 100\%$, dengan a menunjukkan jarak antara titik pusat cendawan ke arah isolat bakteri, b menunjukkan jarak antara titik pusat cendawan ke sisi yang berlawanan tanpa bakteri. Produksi siderofor oleh isolat isolat dideteksi dengan menggunakan media agar-agar *Chrome Azurol S (CAS)*. Produksi kitinase ditentukan dengan menggunakan medium sintetik yang mengandung koloid kitin. Produksi hidrogen sianida diketahui dengan menggunakan indikator alkali pikrat.

Keragaman genetik berdasarkan *amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)* dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* menggunakan primer hulu 63f dan primer hilir 1387r. Primer ini mengamplifikasi sekitar 1.300 bp konsensus gen 16S rRNA yang bersifat umum untuk domain bakteri. Produk amplifikasi 16S rDNA yang telah dipurifikasi dipotong dengan enzim restriksi endonuklease *HaeIII*, *RsaI* dan *AluI* (Fermentas Life Science, Uni

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

© Hak Cipta Milik IPB (Institut Pertanian Bogor) Bogor Agricultural University



Eropa). Pemotongan oleh enzim restriksi dilakukan pada suhu 37°C semalam. Dendrogram filogenetik dibuat dengan menggunakan metode *neighbour-joining* dalam software TREECON for Windows 1.3b. Identifikasi molekuler dan analisis keragaman genetik berdasarkan sekuen gen 16S rRNA dilakukan dengan pencarian kemiripan sekuen menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide* (BLASTN) yang terdapat di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>. Untuk pembuatan pohon filogenetik, sekuen gen 16S rRNA disejajarkan dengan menggunakan clustalW, dan dianalisis berdasarkan metode *neighbour-joining* menurut Jukes dan Cantor dalam program MEGA versi 4.

Deteksi gen yang mengkode sintesis senyawa anticendawan dilakukan dengan metode PCR. Tujuh pasang primer digunakan untuk mengamplifikasi gen *diacetophloroglucinol* (DAPG), fenazin, pioluteorin dan pirolnitrin. Amplifikasi dengan PCR (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, Amerika Serikat) dilakukan dalam 25µl campuran reaksi. Selanjutnya, produk amplifikasi dielektroforesis dengan gel agarosa 1% dalam 1x bufer *Tris Boric acid EDTA* (TBE) selama 30 menit 100 V, diwarnai dengan ethidium bromida, dan difoto di atas *ultraviolet transilluminator*. Kloning gen penyandi senyawa anticendawan dilakukan dengan vektor pCR®4Blunt-TOPO (Invitrogen, Jepang) dan pGEM-T Easy (Promega, Amerika Serikat) menggunakan sel elektro-kompeten *Escherichia coli* TOP 10 dan *E. coli* EPI 300 sebagai sel inang. Sekuensing dikerjakan dengan ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Amerika Serikat). Analisis bioinformasi pencarian kesamaan sekuen nukleotida dilakukan dengan program BLASTN dan protein dengan program BLASTX pada situs NCBI.

Perlakuan benih (*seed coating*) dilakukan dengan melapisi benih dengan bakteri yang telah disuspensikan ke dalam 0.5% karboksil metilselulosa dengan konsentrasi bakteri 10⁷-10⁸ sel/ml. Duapuluh empat benih kedelai yang telah dilapisi dengan masing-masing bakteri ditanam pada tanah yang telah diinfeksi cendawan patogen (10³ cfu/g tanah). Penekanan penyakit dievaluasi setelah satu minggu kecambah muncul dengan menghitung jumlah tanaman yang sehat dan tanaman yang menunjukkan gejala karena serangan cendawan patogen pada kondisi tanah steril dan tanah non steril.

Analisis kemampuan kolonisasi rizosfer dilakukan dengan penandaan resisten antibiotik rifampisin (Rif^r). Perlakuan benih dilakukan dengan cara merendam biji kedelai dalam suspensi bakteri *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r selama 1 jam. Jumlah awal bakteri adalah 10⁶ sel/benih berdasarkan penghitungan bakteri menggunakan *standard plate count*. Pemantauan perkembangan populasi *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r di rizosfer tanaman kedelai pada tanah steril dan non steril dilakukan selama 6 minggu. Penghitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode cawan sebar pada medium agar-agar King's B yang mengandung rifampisin 100 µg/ml.

Sebelas isolat dari delapan puluh satu isolat *Pseudomonas* sp. CRB yang diisolasi dari rizosfer tanaman kedelai telah diseleksi mempunyai sifat-sifat yang dapat berperan sebagai biokontrol. Sifat-sifat biokontrol yang dipunyai adalah menunjukkan penghambatan pertumbuhan radial cendawan patogen akar *R. solani*, *S. rostrii* atau *F. oxysporum in vitro* antara 11.1-60%. Di antaranya, 7 isolat menghasilkan siderofor, 2 isolat menghasilkan kitinase dan 4 isolat menghasilkan hidrogen sianida.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Pemotongan 16S rDNA dengan tiga enzim restriksi *HaeIII*, *RsaI* dan *AluI* menghasilkan 3 sampai 5 pita dengan ukuran yang berbeda untuk masing-masing perlakuan enzim restriksi. Perbedaan pola potongan pita DNA tersebut telah dapat membedakan isolat satu dengan isolat yang lain. Dendrogram berdasarkan ARDRA mengungkapkan tingkat keragaman genetik yang cukup tinggi di antara isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB, karena berdasarkan analisis ini tujuh kelompok ribotipe dapat ditunjukkan. Identifikasi molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rRNA (600 nukleotida) bakteri antagonis *Pseudomonas* sp. CRB mengarah ke spesies yang berbeda dengan identifikasi berdasarkan morfologi dan Biologis Microgen™ tetapi masih pada genus yang sama yaitu *Pseudomonas*. Isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai kemiripan yang tinggi antara 80-100% terhadap berbagai spesies dalam genus *Pseudomonas*. Tingkat kemiripan terhadap berbagai spesies *Pseudomonas* yang beragam juga menunjukkan keragaman spesiesnya. Pohon filogenetik membentuk empat kelompok hubungan kekerabatan. Isolat-isolat yang berada dalam kelompok yang sama mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat.

Enam pasang primer yang digunakan berhasil mengamplifikasi gen target penyandi senyawa anticendawan pada bakteri kontrol positif. Empat pasang primer menghasilkan pita tidak spesifik pada *Pseudomonas* sp. CRB. Selanjutnya, optimasi kondisi PCR dengan primer PHZ1/2 menghasilkan pita spesifik 1.6 kb lebih besar pada *Pseudomonas* sp. CRB 80 dan 102 dibandingkan dengan ukuran yang seharusnya 1.4 kb. BLASTN menunjukkan 785 bp dari sekuen lengkap tersebut paling mirip 92% dengan nukleotida *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class I* dari *Pseudomonas putida* KT2440. BLASTX protein dari nukleotida yang ditranslasi menunjukkan kemiripan 242 asam amino dengan *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class I* dari *Pseudomonas putida* GB-1. *Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* adalah gen *phzF*. *PhzF* adalah bagian dari 7 gen penyandi biosintesis fenazin pada *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Hasil ini menunjukkan bahwa bagian gen penyandi biosintesis fenazin, *phzF*, dapat terdeteksi dan terkonfirmasi pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102. Pada *Pseudomonas* sp. CRB yang lain, biosintesis senyawa anticendawan selain fenazin, pioluteorin, pirolnitrin atau diasetilfloroglusinol diperkirakan terlibat dalam antibiosis.

Hampir semua *Pseudomonas* sp. CRB, kecuali CRB-3 pada tanah steril, dapat mengurangi jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit karena serangan cendawan patogen tular tanah dan memberikan penekanan penyakit. Perlakuan benih dengan *Pseudomonas* sp. CRB memberikan penekanan penyakit *planta* sekitar 14.3-100% pada tanah steril dan 5.2-52.6% pada tanah non steril. *Pseudomonas* sp. CRB-16, CRB-44, CRB-86, CRB-102 dan CRB-109 yang masih menunjukkan penekanan penyakit cukup tinggi, lebih dari 30% pada tanah non steril dapat dipertimbangkan untuk dikembangkan sebagai agen pengendalian hayati untuk aplikasi ke lapang.

Kerapatan populasi di rizosfer *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80 dan CRB-102 Rif^r yang dipelajari kemampuan kolonisasinya antara 10²-10⁷ sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 0-10⁶ sel/g berat akar segar pada tanah non steril. Jumlah sel *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r berkurang sedikit pada tanah non steril dibandingkan dengan pada tanah steril karena bakteri harus bertahan dan berkompetisi dengan mikroba lain yang telah ada di tanah sebelumnya.