



BAB 6

KOLONISASI RIZOSFER

Pendahuluan

Kolonisasi *rhizoplane* atau jaringan akar oleh mikroba dikenal sebagai kolonisasi akar, sedangkan kolonisasi mikroba di tanah sekitar perakaran yang masih terpengaruh oleh akar dikenal sebagai kolonisasi rizosfer (Kloepper *et al.* 1991). Kemampuan mengkolonisasi rizosfer telah dipertimbangkan sebagai faktor utama yang menentukan efektif dan efisien inokulum untuk mengontrol penyakit tanaman (Compant *et al.* 2005). Keberhasilan kolonisasi rizosfer dan bertahan hidup oleh bakteri biokontrol telah didemonstrasikan sebagai suatu persyaratan yang tidak dapat ditinggalkan untuk aplikasinya (Chin-A-Woeng *et al.* 2000). Kemampuan bakteri untuk berhasil mencapai jumlah populasi yang berarti pada permukaan akar tanaman inang adalah sesuatu yang sangat penting untuk memberikan pengaruh dari sifat-sifat bakteri yang menguntungkan pada kesehatan tanaman.

Kemampuan menanggapi bahan-bahan kimia yang dilepaskan oleh tanaman inang dan bergerak ke arah sistem perakaran merupakan kemampuan yang penting untuk memantapkan keberadaan bakteri di rizosfer (Vande Broek & Vanderleyden 1995). Rizobakteria mencapai permukaan akar dengan cara aktif bergerak yang difasilitasi oleh adanya flagela dan dipandu oleh respon kemotaksis (De Weert *et al.* 2002). Senyawa yang menarik bakteri untuk datang, suatu kemoatraktan, biasanya adalah nutrisi yang diperlukan oleh bakteri. Kemoatraktan yang diketahui ada dalam eksudat akar adalah asam-asam organik, asam-asam amino dan gula tertentu. Kemampuan bakteri berkompetisi dalam mendapatkan nutrisi yang ada pada benih dan eksudat akar merupakan hal yang menentukan dalam proses kolonisasi (Simons *et al.* 1996). Eksudat akar dikenali, digunakan dan diproses oleh rizobakteria sebagai nutrisi, sinyal atau toksin.

Selama kolonisasi akar, rizobakteria menghasilkan beragam bahan-bahan yang menghambat pertumbuhan patogen tanaman. Metabolit sekunder antibiotik dan siderofor dipertimbangkan berperan penting dalam biokontrol terhadap patogen tanaman oleh kelompok *Pseudomonas*. Sehubungan dengan aktivitas biokontrol, Haas dan Defago (2005) menjelaskan tiga mekanisme aksi, yaitu antibiosis,



elisitasi induksi resistensi sistemik dan terbentuknya interaksi khusus patogen-antagonis dapat terjadi pada saat bakteri berkolonisasi di perakaran.

Untuk melacak rizobakteria yang diintroduksi ke lingkungan yang kompleks seperti tanah memerlukan sifat yang dapat dibedakan antara bakteri tersebut dengan mikroba asli. Kolonisasi dan kemampuan bertahan hidup rizobakteria yang diintroduksi di rizosfer juga dapat dipelajari dan dimonitor dengan lebih jelas dengan cara memberikan pembeda dengan bakteri yang ada di lingkungan tersebut. Untuk membedakan galur yang diintroduksi dari mikroorganismanya, suatu sistem penanda (*marker*) sangat diperlukan (Chabot *et al.* 1996; Mahaffee *et al.* 1997). Beberapa penanda molekuler seperti resisten antibiotik, kromogenik (*xylE*, *gusA*, dan *lacZ*), bioluminesen (*luxAB* dan *luc*) dan fluoresen (*green fluorescent protein (gfp)*) telah dikembangkan dan diaplikasikan secara luas untuk mempelajari kolonisasi akar (Gamalero *et al.* 2003). Gen *ice nucleation active (inaZ)* yang mengkode protein kristal es dapat juga dikembangkan sebagai penanda molekuler (Loper & Lindow 1994).

Penandaan bakteri dapat dilakukan dengan resisten antibiotik melalui mutasi spontan (*spontaneously antibiotic-resistance*). Resistensi rifampisin terbukti dapat digunakan sebagai penanda untuk mempelajari kinetika pertumbuhan dan bertahan hidup bakteri yang diintroduksi di rizosfer. Kestabilan resistensi rifampisin telah dibuktikan pada *Pseudomonas putida* WCS 358 pada kondisi lapangan (Glandorf *et al.* 1992) dan *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1 pada tanah dalam pot plastik selama 60 hari percobaan (Ji *et al.* 2010). Dengan penandaan resisten antibiotik dapat dimungkinkan untuk memonitor dan mengevaluasi lebih jelas aktivitas bakteri yang dipelajari dan dapat dibedakan dengan bakteri lainnya yang tidak mempunyai sifat tersebut.

Tujuan Penelitian

3. Menandai *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan menggunakan penanda resisten rifampisin melalui mutasi spontan.
4. Mengetahui pertumbuhan spesifik dan morfologi koloni *Pseudomonas* sp. CRB mutan resisten rifampisin (Rif^r) dibandingkan dengan tipe liarnya.

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 memunculkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

5. Mengetahui kemampuan kolonisasi *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r di rizosfer tanaman kedelai.

Bahan dan Metode

Mutasi spontan resisten antibiotik rifampisin. *Pseudomonas* sp. CRB-3, isolat yang menunjukkan penekanan penyakit *in planta* pada tanah steril dan CRB-17, CRB-80, CRB-102, isolat-isolat yang menunjukkan penekanan penyakit paling tinggi terhadap masing-masing cendawan patogen tular tanah *in planta* pada tanah steril dipilih untuk studi kolonisasi. Mutan resisten antibiotik rifampisin (Rif^r) *Pseudomonas* sp. CRB diperoleh dengan cara memindahkan koloni bakteri tersebut ke dalam medium King's B cair yang mengandung antibiotik rifampisin dengan konsentrasi yang makin meningkat (50, 100 µg/ml). Stabilitas mutan diuji dengan men-sub kultur mutan pada medium agar-agar King's B yang mengandung rifampisin 100 µg/ml berturut-turut setelah 48 jam sebanyak 3 kali (Glandorf *et al.* 1992).

Pertumbuhan spesifik *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r. Untuk mengetahui perbandingan pertumbuhan spesifik antara mutan dan tipe liarnya, laju pertumbuhan spesifik ditentukan untuk masing-masing *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r dan tipe liarnya. Bakteri ditumbuhkan dalam medium cair King's B yang ditambahkan rifampisin 100 µg/ml untuk mutan dan King's B cair untuk tipe liar. Laju pertumbuhan spesifik dianalisis dengan mengukur kerapatan optik sel pada 550 nm setiap 2 jam, selama 24 jam ketika fase stasioner dicapai. Untuk masing-masing perlakuan dilakukan dua ulangan.

Kolonisasi rizosfer pada tanah steril dan non steril

Penyiapan tanah. Tanah utisol 2 kg dan pupuk kandang (5g/kg tanah) dipersiapkan untuk percobaan ini. Satu bagian tanah disterilkan sebagian tanah yang lain tidak disterilkan. Sterilisasi tanah dilakukan dengan *autoclave*, dalam 3 hari berturut-turut, masing-masing selama 1 jam pada suhu 121°C. Tanah yang telah disterilisasi atau tanah yang tidak disterilisasi, selanjutnya dimasukkan



ke dalam *polybag*. Percobaan dilakukan di rumah kaca dengan kondisi temperatur 28-32°C, masing-masing percobaan dilakukan dua ulangan. Penyiraman dilakukan ke dalam masing-masing *polybag* sebanyak kapasitas lapangnya, dua kali sehari.

Sterilisasi benih kedelai. Benih kedelai disterilisasi dengan sterilisasi permukaan. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan cara merendam benih berturut-turut ke dalam etanol 70% selama 1 menit, ke dalam natrium hipoklorida (NaOCl) 1% selama 5 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 5 kali. Selanjutnya, benih tersebut direndam dalam akuades steril selama 3 jam.

Perlakuan benih. Benih kedelai yang sudah steril, selanjutnya direndam dalam suspensi bakteri *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r selama 1 jam. Jumlah bakteri awal adalah 10⁶/benih berdasarkan penghitungan bakteri menggunakan *standard plate count*. Sebagai kontrol, benih direndam di air steril. Benih yang sudah dilapisi bakteri dan benih kontrol dikecambahkan dalam cawan Petri steril berisi kertas saring yang telah dibasahi dengan akuades steril selama 2 hari dalam kondisi gelap. Benih yang berkecambah ditanam di *polybag* berisi tanah steril dan non steril.

Pengamatan kolonisasi rizosfer pada tanaman kedelai. Pemantauan perkembangan populasi *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r di rizosfer tanaman kedelai pada tanah steril dan non steril dilakukan selama 6 minggu. Tiap minggu dilakukan pengambilan sampel. Bakteri yang ada di rizosfer tanaman kedelai ditumbuhkan dengan metode cawan sebar pada medium agar-agar King's B yang mengandung rifampisin 100 µg/ml. Tanaman dicabut dari tanah dengan hati-hati, dipotong pada bagian akarnya. Tanah yang menempel lemah pada akar dihilangkan dengan mengibaskan akar secara perlahan. Akar beserta tanah rizosfer yang masih tetap melekat selanjutnya dimasukkan ke dalam 100 ml larutan garam fisiologi NaCl 0.85%, digoyang selama 1 jam di atas pengoyang dengan kecepatan tinggi 120 rpm. Sebanyak 1 ml suspensi tersebut diambil, dilakukan pengenceran berseri dan disebar sebanyak 100 µl di medium agar-agar King's B yang mengandung rifampisin 100 µg/ml. Jumlah total mikrob lain pada tanah non steril ditumbuhkan pada *Plate Count Agar* (PCA). Diinkubasi selama 24 jam dan dihitung jumlah bakteri yang tumbuh berdasarkan *standard plate*

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:

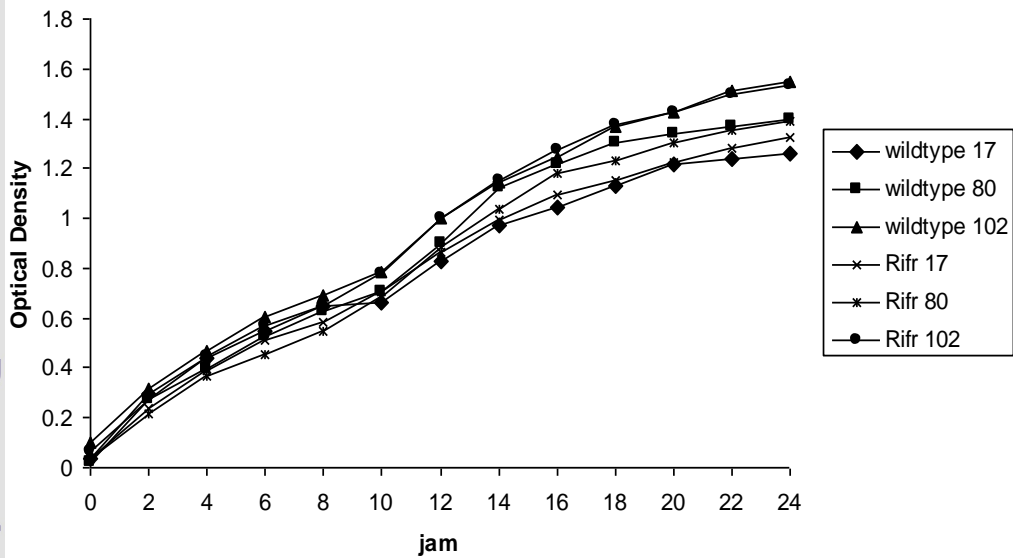
- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

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

count. Banyaknya bakteri yang tumbuh menunjukkan kemampuan kolonisasi akar bakteri tersebut pada tanaman kedelai.

Hasil

Pseudomonas sp. CRB mutan resisten rifampisin (Rif^r) dapat diperoleh dengan metode resisten spontan untuk CRB-17, CRB-80 dan CRB-102 tetapi tidak untuk CRB-3. *Pseudomonas* sp. CRB-3 tidak dapat tumbuh saat dipindahkan dari medium cair ke medium agar-agar King's B yang mengandung rifampisin. Resistensi rifampisin tidak stabil pada bakteri ini. *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r mutan dapat tumbuh dalam medium King's B yang mengandung rifampisin 100 µg/ml. Laju pertumbuhan spesifik *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80, CRB-102 dan hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa resistensi rifampisin spontan tidak mengurangi laju pertumbuhan spesifik dari bakteri tersebut. Dalam medium yang mengandung rifampisin, *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r mutan dapat tumbuh normal dan mudah memperbanyak diri hampir sama dengan tipe liarnya yang tumbuh di medium tanpa rifampisin (Gambar 20).

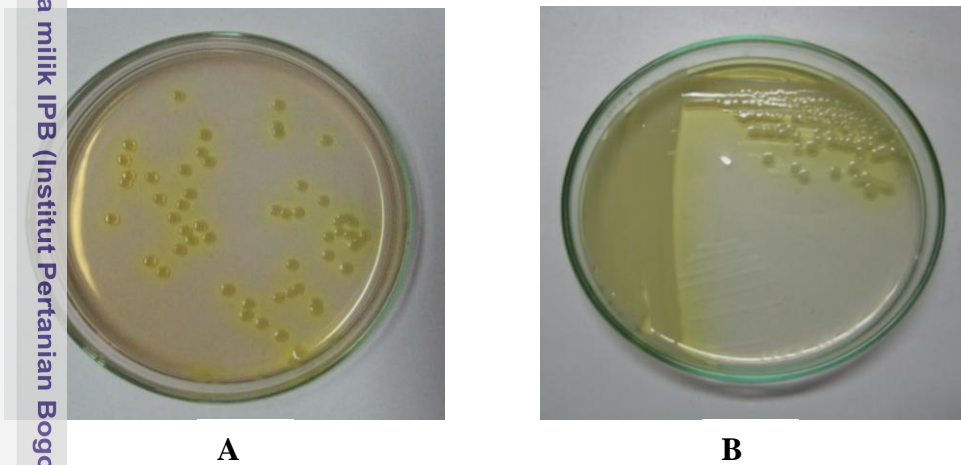


Gambar 20 Kurva pertumbuhan *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80, CRB-102 tipe liar dan mutan resisten rifampisin (Rif^r).

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 mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Secara morfologi *Pseudomonas* sp. CRB mutan resisten rifampisin (Rif^r) juga dibandingkan dengan tipe liar untuk memastikan bahwa keduanya masih menunjukkan morfologi koloninya yang sama. *Pseudomonas* sp. CRB-17 mutan resisten rifampisin (Rif^r) dan tipe liar masih menunjukkan morfologi koloni yang hampir sama (Gambar 21), demikian juga dengan CRB-80 dan CRB-102. Morfologi koloni CRB-17 dan CRB-80 di medium King's B adalah berbentuk bulat, berwarna kuning fluoresen, sementara CRB-102 berbentuk bulat, berwarna putih sem.



Gambar 21 Morfologi koloni *Pseudomonas* sp. CRB-17 (Rif^r), biakan umur 48 jam pada medium King's B + rifampisin 100 µg/ml (A) dan tipe liarnya pada medium King's B (B). Koloni bentuk bulat berwarna kuning fluoresen.

Kemampuan antagonis *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r terhadap cendawan patogen masih terlihat dalam cawan Petri (Gambar 22). Kemampuan antagonis juga masih terlihat setelah bakteri tersebut diisolasi kembali dari rizosfer tanaman kedelai dalam asai kolonisasi akar pada tanah non steril. Penandaan dengan resisten antibiotik rifampisin dapat dilakukan terhadap *Pseudomonas* sp. CRB tanpa mengubah laju pertumbuhan spesifik, sifat morfologi koloni maupun aktivitas antagonis bakteri tersebut. Oleh karenanya, penandaan dengan resisten antibiotik rifampisin dapat dilakukan terhadap *Pseudomonas* sp. CRB untuk mempelajari kemampuan kolonisasi perakaran.

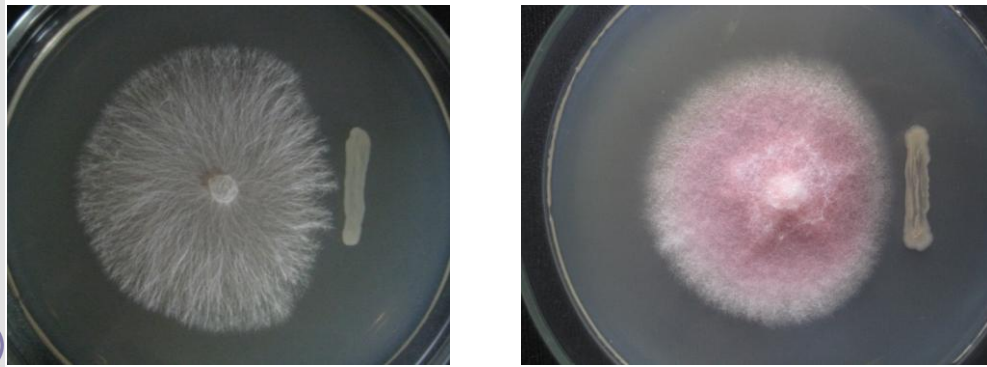
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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.

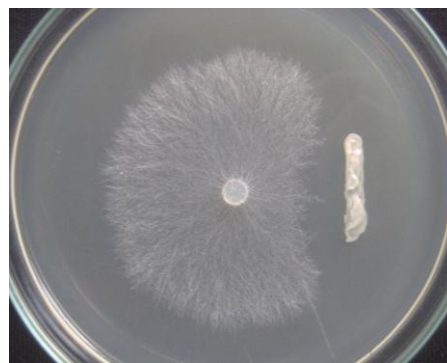
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

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



A

B



C

Gambar 22 Antagonisme *Pseudomonas* sp. CRB-80 Rif^r (mutan resisten rifampisin) terhadap cendawan *S. rolfsii* (A), *Pseudomonas* sp. CRB-17 Rif^r terhadap *F. oxysporum* (B) dan *Pseudomonas* sp. CRB-102 Rif^r terhadap *R. solani* (C) di cawan Petri.

Pada akar tanaman kedelai, *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80, dan CRB-102 dapat mengkolonisasi rizosfer dengan menjaga jumlah populasi antara 10^2 - 10^7 sel/gram berat akar segar pada tanah steril dan 0 - 10^6 sel/gram berat akar segar pada tanah non steril. *Pseudomonas* sp. CRB-17 menunjukkan kolonisasi yang lebih baik dibandingkan dengan CRB-80 dan CRB-102. Bakteri ini dapat menjaga keberadaan selnya lebih dari 10^3 selama 6 minggu pengamatan pada tanah steril (Gambar 23A). Tidak ada jumlah sel *Pseudomonas* sp. CRB yang terdeteksi pada perlakuan kontrol. Jumlah sel *Pseudomonas* sp. CRB berkurang sedikit pada tanah non steril dibandingkan dengan pada tanah steril (Gambar 23B). Bakteri ini harus bertahan dan berkompetisi dengan mikroba lain yang telah ada di tanah sebelumnya. Jumlah mikroba lain meningkat seiring dengan lama waktu pengamatan mencapai 10^5 - 10^6 sel/gram berat akar segar.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

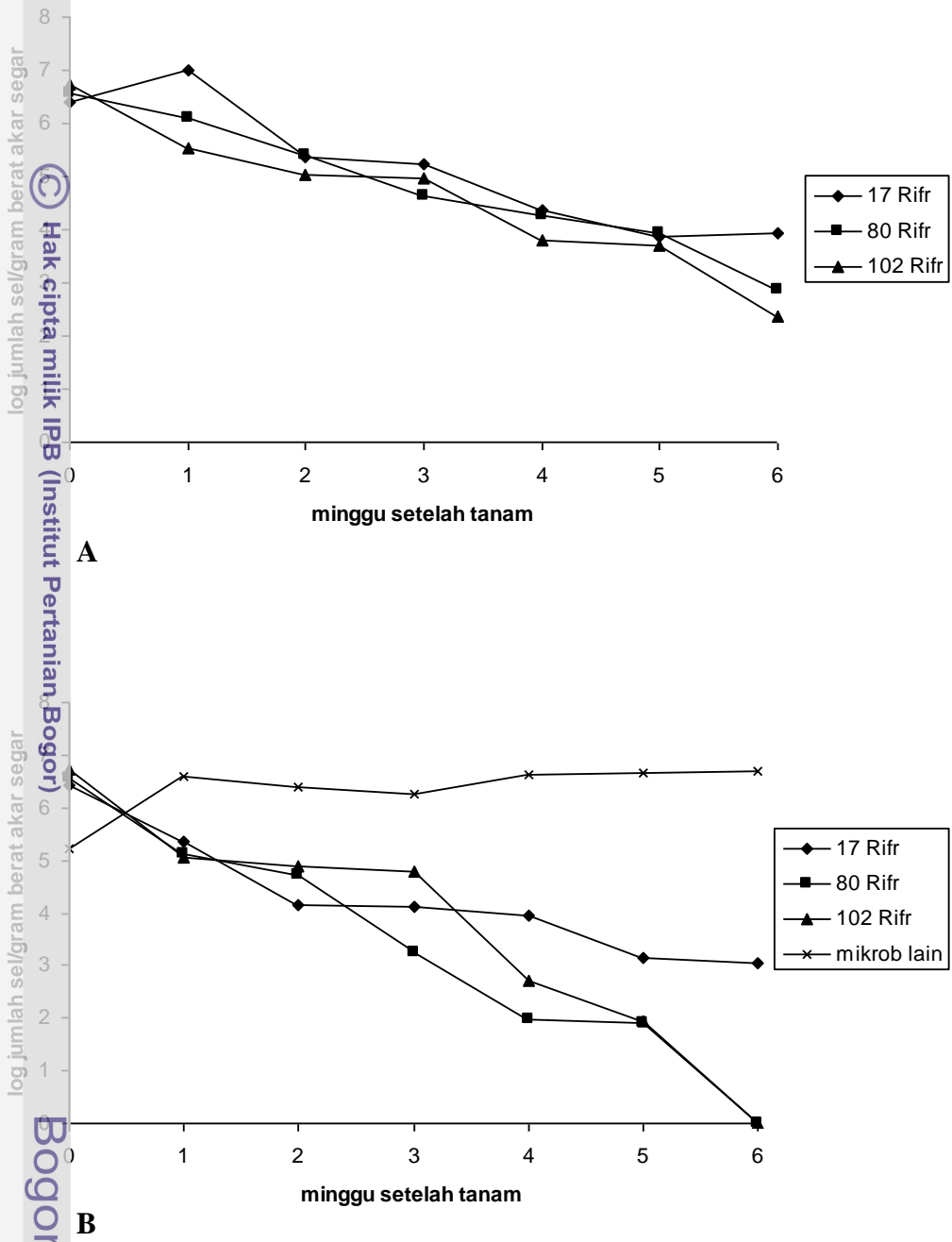
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - 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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 23 Kolonisasi rizosfer *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80 dan CRB-102 mutan resisten rifampisin (Rif^r) pada akar tanaman kedelai, pada tanah steril (A) dan tanah non steril (B).



Pembahasan

Pada percobaan kolonisasi rizosfer, penandaan dengan resisten antibiotik rifampisin dapat digunakan untuk memonitor jumlah populasi *Pseudomonas* sp. CRB di rizosfer tanaman kedelai yang ditumbuhkan dalam tanah di *polypropylene bag*. Laju pertumbuhan dan sifat morfologi mutan resisten rifampisin (Rif^r) tidak berubah dibandingkan dengan dengan tipe liarnya tetapi dapat dibedakan dengan mikroba lain karena sifat resisten antibiotik rifampisin. Stabilitas resisten rifampisin dalam *Pseudomonas* sp. CRB dapat ditunjukkan dengan mengisolasi kembali mutan Rif^r secara teratur setiap minggu selama 6 minggu setelah diinokulasikan ke rizosfer melalui perlakuan benih. Menurut Bergsma-Vlami *et al.* (2005) untuk memudahkan pendeteksian bakteri di rizosfer, *Pseudomonas* spp. yang menghasilkan antibiotik *diacetylphloroglucinol* (*phlD*⁺) juga dilakukan mutasi resisten rifampisin secara spontan sebelum diinokulasikan ke tanah selain dideteksi menggunakan metode *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE).

Menjaga ambang batas populasi mikroba pada jumlah yang mencukupi di rizosfer sangat penting dalam aplikasi biokontrol untuk mencegah atau mengurangi infeksi oleh patogen atau menginduksi pertahanan tanaman. Selama 6 minggu pengamatan, tiga minggu pertama menunjukkan jumlah sel yang cukup banyak pada kolonisasi rizosfer. *Pseudomonas* sp. CRB yang diinokulasikan dapat menjaga kerapatan populasi di rizosfer antara 10⁴-10⁷ sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 10³-10⁶ sel/g berat akar segar di tanah non steril. *Pseudomonas* sp. CRB-17 menunjukkan kolonisasi akar yang lebih baik dibandingkan dengan CRB-80 dan CRB-102. Isolat ini dapat mempertahankan keberadaan selnya sekitar 10³-10⁷ sel/gram berat segar akar selama 6 minggu pengamatan pada tanah steril. Akan tetapi jumlah sel *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102 makin berkurang, sampai tidak dapat ditemukan lagi pada tanah non steril. Hal ini menunjukkan bahwa, selama 3 minggu pertama, *Pseudomonas* sp. CRB diperkirakan dapat mengkolonisasi perakaran untuk memberikan sifat-sifat sebagai biokontrol, terutama tahap awal pertumbuhan tanaman yang lebih tahan terhadap infeksi patogen. Kolonisasi perakaran yang baik memperlihatkan penekanan penyakit yang baik. Ketika kolonisasi rizosfer pada tanah steril lebih banyak dibandingkan di tanah non steril, penekanan penyakit oleh *Pseudomonas*

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.



sp. CRB-17 terhadap *F. oxysporum*, CRB-80 terhadap *S. rolfsii* dan CRB-102 terhadap *R. solani* di tanah steril menunjukkan persentase yang lebih tinggi (Tabel 14). Sejalan dengan hasil penelitian ini, Bergsma-Vlami *et al.* (2005) melaporkan juga bahwa berdasarkan pengenceran berseri dan hitungan cawan, kerapatan populasi rizosfer berkisar antara 5×10^2 sampai 5×10^6 cfu/g berat akar segar setelah 10-12 hari penanaman. Penelitian yang lain juga menunjukkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* strain Q8r1-96 mempertahankan kerapatan populasi rizosfer sekitar 10^5 cfu/g akar segar setelah delapan siklus pertumbuhan berturut-turut tanaman gandum dan masih dapat mengontrol penyakit *take-all* pada tingkat yang sama seperti yang diperoleh pada tanah yang menekan penyakit (*take-all suppressive soil*) (Raaijmakers & Weller 2001).

Simpulan

1. Penandaan resisten antibiotik rifampisin 100 µg/ml dengan cara mutasi spontan dapat dilakukan pada *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80 dan CRB-102, tetapi tidak pada CRB-3.
2. *Pseudomonas* sp. CRB mutan resisten rifampisin (Rif^r) menunjukkan laju pertumbuhan spesifik dan morfologi koloni yang hampir sama dengan tipe liar dan mempunyai sifat yang dapat dibedakan dengan mikrob lain berdasarkan sifat resisten rifampisin, oleh karenanya dapat digunakan untuk mempelajari kemampuan kolonisasi rizosfer.
3. Kerapatan populasi di rizosfer *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80 dan CRB-102 Rif^r yang dipelajari kemampuan kolonisasinya antara 10^2 - 10^7 sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 0 - 10^6 sel/g berat akar segar pada tanah non steril selama 6 minggu pengamatan. Pada tiga minggu pertama, *Pseudomonas* sp. CRB yang diinokulasikan dapat menjaga kerapatan populasi di rizosfer antara 10^4 - 10^7 sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 10^3 - 10^6 sel/g berat akar segar di tanah non steril. *Pseudomonas* sp. CRB dapat mengkolonisasi perakaran untuk memberikan sifat-sifat sebagai biokontrol, terutama tahap awal pertumbuhan tanaman yang lebih rentan terhadap infeksi patogen.

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:

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



- 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.

BAB 7

PEMBAHASAN UMUM

Tanaman muda yang masih baru berkecambah mudah diserang oleh cendawan patogen tular tanah. Serangan ini mengurangi pertumbuhan tanaman dan selanjutnya mengurangi hasil panen. Penyakit busuk kecambah, busuk akar dan batang karena cendawan patogen tular tanah *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani* pada tanaman kedelai masih dianggap penting. Perlakuan benih kedelai dengan fungisida dapat melindungi kecambah dari serangan cendawan patogen tular tanah, memperbaiki tegakan tanaman dan mengurangi penyebaran penyakit yang terbawa biji. Akan tetapi, sebagian besar fungisida untuk perlakuan benih pada biji kedelai mempunyai efek negatif terhadap *Rhizobium*. Fungisida mengurangi viabilitas *Rhizobium*. Fungisida dapat menjadi inhibitor potensial dalam nodulasi tanaman kedelai, sebagai akibatnya adalah gangguan perkembangan tanaman dan penurunan hasil panen. Di Indonesia, bakteri rizosfer asli tanaman kedelai seperti bakteri *Pseudomonas* sp. belum banyak dilaporkan dan potensinya sebagai agen pengendali hayati cendawan patogen tular tanah perlu dieksplorasi lebih jauh. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan kandidat agen biokontrol terhadap cendawan patogen tular tanah *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* atau *Rhizoctonia solani* untuk tanaman kedelai.

Bakteri yang diisolasi dari rizosfer tanaman kedelai diidentifikasi berdasarkan sifat morfologi dan fisiologi dan diseleksi berdasarkan sifat-sifat antagonis terhadap cendawan patogen tular tanah *in vitro*. Sebanyak 81 isolat diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* sp dapat diisolasi dari rizosfer tanaman kedelai di daerah Cirebon, Jawa Barat. Selanjutnya, isolat tersebut diberi nama *Pseudomonas* sp. CRB berdasarkan daerah asal isolatnya yaitu Cirebon. Sebelas isolat di antaranya, yaitu *Pseudomonas* sp. CRB-3, CRB-16, CRB-17, CRB-31, CRB-44, CRB-75, CRB-80, CRB-86, CRB-102, CRB-109 dan CRB-112 mempunyai sifat-sifat biokontrol yaitu menunjukkan penghambatan pertumbuhan radial cendawan patogen tular tanah *S. rolfsii*, *F. oxysporum* atau *R. solani*. Di antara isolat-isolat tersebut juga menghasilkan senyawa anticendawan lainnya seperti siderofor, kitinase dan hidrogen sianida. Isolat-isolat yang mempunyai satu



atau lebih sifat-sifat anticendawan akan menguntungkan karena dapat memberikan beberapa cara untuk melawan cendawan patogen. Bakteri yang mempunyai sifat-sifat biokontrol berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pengendali hayati penyakit cendawan tular tanah.

Identifikasi molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rRNA isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan menunjukkan spesies yang berbeda dengan identifikasi morfologi dan fisiologis Microgen™ tetapi masih pada genus yang sama yaitu *Pseudomonas*. Identifikasi molekuler melengkapi sifat fenotif yang sangat bervariasi tetapi tidak cukup sebagai pembedaan antar spesies. Identifikasi bakteri antagonis yang tepat sangat penting sebelum bakteri tersebut dapat diaplikasikan untuk biokontrol. Analisis *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA) dari 11 *Pseudomonas* sp. CRB menunjukkan tujuh kelompok ribotipe. Oleh karenanya, *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai keragaman yang tinggi di antara isolat-isolatnya. Tingkat kemiripan sekuen gen 16S rRNA yang beragam terhadap berbagai spesies *Pseudomonas* juga menunjukkan keragaman spesiesnya. Keragaman genetik *Pseudomonas* sp. CRB penghasil anticendawan yang tinggi memberikan keuntungan untuk dapat memilih isolat yang paling baik, yang sesuai dengan kemampuannya dalam menekan penyakit dan kompetensinya berada di rizosfer atau dikembangkan semuanya sekaligus. Keragaman genetik di antara isolatnya merupakan sumbangan untuk deposit gen di koleksi kultur yang dapat dikembangkan lebih lanjut.

Penghambatan cendawan patogen secara *in vitro* memberikan spekulasi adanya produksi senyawa anticendawan. Pendekatan yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya gen penyandi senyawa anticendawan pada bakteri *Pseudomonas* sp. CRB adalah dengan menggunakan primer spesifik yang telah diketahui di antaranya, seperti senyawa anticendawan fenazin, pioluteorin, pirolnitrin atau diasetilfloroglusinol. Bagian gen penyandi biosintesis anticendawan fenazin, *phzF*, yaitu *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* dapat dideteksi 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. Pendekatan penelitian yang lain diperlukan untuk mengetahui

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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



senyawa anticendawan yang dihasilkan oleh isolat-isolat tersebut atau mendeteksi gen penyandi biosintesis anticendawan yang lain, yang belum diketahui atau mungkin baru.

Kemampuan penekanan penyakit oleh *Pseudomonas* sp. CRB yang mempunyai sifat antagonis terhadap cendawan patogen tular tanah diuji secara *in planta*. 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. Oleh karenanya, isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB memberikan harapan untuk dikembangkan menjadi agen biokontrol terhadap cendawan patogen tular tanah. Antibiosis, kompetisi atau induksi resistensi sistemik diperkirakan terlibat dalam penekanan penyakit. Beberapa isolat menunjukkan penekanan penyakit lebih tinggi pada tanah steril dibandingkan dengan pada tanah non steril. Sebaliknya, beberapa isolat yang lain menunjukkan penekanan penyakit yang lebih tinggi pada tanah non steril dibandingkan dengan pada tanah steril. *Pseudomonas* sp. CRB-16, CRB-44, CRB-86, CRB-102 dan CRB-109 yang 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 10^2 - 10^7 sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 0 - 10^6 sel/g berat akar segar pada tanah non steril selama 6 minggu pengamatan. Jumlah sel *Pseudomonas* sp. CRB-Rif^r berkurang sedikit pada tanah non steril karena bakteri harus bertahan dan berkompetisi dengan mikroba lain yang telah ada di tanah sebelumnya. Pada tiga minggu pertama, *Pseudomonas* sp. CRB yang diinokulasikan dapat menjaga kerapatan populasi di rizosfer antara 10^4 - 10^7 sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 10^3 - 10^6 sel/g berat akar segar di tanah non steril. Hasil ini menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. CRB dapat mengkolonisasi perakaran untuk memberikan sifat-sifat sebagai biokontrol, terutama tahap awal pertumbuhan tanaman yang lebih rentan terhadap infeksi patogen. Bakteri pengkolonisasi rizosfer yang baik harus dapat mempertahankan jumlah yang tinggi di daerah perakaran. Meskipun

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 mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



demikian, kurva yang didapatkan dari data jumlah bakteri di rizosfer mengalami penurunan selama 6 minggu pengamatan. Jika terjadi hal yang demikian, maka dalam aplikasinya nanti perlu ditambahkan dengan cara menginokulasikan bakteri tersebut secara berulang untuk menjaga jumlahnya tetap tinggi.

Dari penelitian ini, bioasai *in vitro* dapat menyeleksi sifat-sifat antagonis yang beragam yang dimiliki bakteri rizosfer. Bioassai *in planta* terutama pada tanah non steril dapat membuktikan kemampuan sesungguhnya bakteri antagonis melawan cendawan patogen tular tanah yang menyerang tanaman dan menekan penyakit. Untuk mendapatkan kandidat agen biokontrol yang dapat digunakan untuk aplikasi di lapang, sifat penekanan penyakit *in planta* yang cukup tinggi pada tanah non steril merupakan sifat yang menentukan. Sifat ini akan sesuai dengan kondisi yang ada di lapang. Untuk mendapatkan agen biokontrol terhadap cendawan patogen tular tanah yang nantinya dapat melindungi tanaman kedelai, bioassai *in vitro* dilakukan lebih dahulu dan kemudian bioassai *in planta* menunjukkan hasil yang kurang efisien. Hasil antara bioassai *in vitro* dan *in planta* sifat antagonis bakteri terhadap cendawan patogen sangat mungkin bervariasi. Sifat-sifat bakteri dan kondisi faktor lingkungan yang lain diperkirakan sebagai penyebabnya. Sifat antagonis pada bioassai *in vitro* yang bagus belum tentu diikuti sifat antagonis *in planta* yang juga bagus. Oleh karenanya, dalam mendapatkan kandidat agen biokontrol akan lebih bijaksana apabila paradigma bioassai *in vitro* lebih dahulu, kemudian bioassai *in planta* diubah menjadi bioassai *in planta* lebih dahulu kemudian bioassai *in vitro* untuk pembuktian adanya sifat-sifat biokontrolnya.

SIMPULAN

Sebelas isolat *Pseudomonas* sp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman kedelai mempunyai sifat-sifat biokontrol. Sifat-sifat biokontrol yang dimiliki ialah antagonis terhadap cendawan patogen tular tanah *S. rolfisii*, *F. oxysporum* *R. solani* *in vitro*, menghasilkan siderofor, kitinase atau hidrogen sianida. Isolat-isolat yang mempunyai sifat-sifat biokontrol berpotensi sebagai agen biokontrol.

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:

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

Tingkat keragaman genetik tinggi di antara isolat-isolat dengan terbentuknya 7 kelompok ribotipe berdasarkan analisis kluster *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA). Berdasarkan sekuen gen 16S rRNA (600 nukleotida), isolat *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai kemiripan yang tinggi antara 83-100% terhadap berbagai spesies dalam genus *Pseudomonas*. Tingkat kemiripan yang beragam menunjukkan keragaman isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan.

Bagian dari gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan fenazin, *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* yaitu *phzF* dapat terdeteksi dan dikonfirmasi pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102. Biosintesis senyawa anticendawan lain, yang mungkin baru atau belum teridentifikasi diperkirakan terlibat dalam antibiosis *Pseudomonas* sp. CRB yang lainnya.

Pseudomonas sp. CRB yang mempunyai sifat biokontrol menunjukkan penekanan penyakit *in planta* 14.3-100% pada tanah steril dan 5.2-52.6% pada tanah non steril. Konsistensi penekanan penyakit yang tetap tinggi lebih dari 30% pada tanah non steril menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. CRB-16, CRB-44, CRB-86, CRB-102, CRB-109 paling berpotensi sebagai kandidat agen biokontrol yang nantinya akan dikembangkan untuk aplikasi ke lapangan.

Kerapatan populasi di rizosfer *Pseudomonas* sp. CRB-17, CRB-80 dan CRB-102 Rif^r antara 10^2 - 10^7 sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 0 - 10^6 sel/g berat akar segar pada tanah non steril selama 6 minggu pengamatan. Pada tiga minggu pertama, *Pseudomonas* sp. CRB yang diinokulasikan dapat menjaga kerapatan populasi di rizosfer antara 10^4 - 10^7 sel/g berat akar segar pada tanah steril dan 10^3 - 10^6 sel/g berat akar segar pada tanah non steril. *Pseudomonas* sp. CRB dapat mengkolonisasi perakaran untuk memberikan sifat-sifat sebagai biokontrol, terutama tahap awal pertumbuhan tanaman yang lebih rentan terhadap infeksi patogen.

SARAN

Dari penelitian ini, hasil antara bioasai *in vitro* dan *in planta* sifat antagonis bakteri terhadap cendawan patogen sangat bervariasi, sifat-sifat bakteri



dan kondisi faktor lingkungan yang lain diperkirakan mempengaruhi hasilnya. Sifat antagonis pada bioassai *in vitro* yang bagus belum tentu diikuti sifat antagonis *in planta* yang bagus juga. Oleh karenanya, dalam mendapatkan kandidat agen biokontrol akan lebih bijaksana apabila paradigma bioassai *in vitro* lebih dahulu, kemudian bioassai *in planta* diubah menjadi bioassai *in planta* lebih dahulu kemudian bioassai *in vitro* untuk mengkaji mekanisme pengendalian hayati yang terkait.

Deteksi dan karakterisasi gen penyandi senyawa anticendawan yang telah dilakukan dengan primer spesifik fenazin, pioluteorin, pirolnitrin dan diasetil fluoroglusinol belum dapat menunjukkan adanya gen penyandi senyawa anticendawan yang dimiliki dan yang diperkirakan terlibat dalam antagonisme dan penekanan penyakit pada *Pseudomonas* sp. CRB selain CRB-80 dan CRB-102. Pendekatan penelitian yang lain diperlukan untuk mengetahui senyawa anticendawan yang dihasilkan oleh isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB yang mungkin baru.

Penelitian untuk mengekstraksi metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing *Pseudomonas* sp. CRB, selanjutnya diidentifikasi menggunakan kromatografi untuk mengetahui senyawa anticendawan perlu dilakukan. Identifikasi gen yang berperan dalam antagonisme dan penekanan penyakit melalui transposon mutagenesis juga perlu dilakukan. Jika transposon menyisip di antara suatu gen dan menghasilkan mutan yang kehilangan sifat antagonisme dan kemampuan penekanan penyakit, maka gen yang tersisip tersebut diperkirakan berperan dalam sifat antagonis dan penekanan penyakit. Selanjutnya gen tersebut dapat diidentifikasi dan dikarakterisasi. Penelitian tentang sinergisme *Pseudomonas* sp. CRB dengan *Rhizobium* juga tidak dapat ditinggalkan karena salah satu sifat yang penting sebagai agen hayati untuk tanaman kedelai adalah sifat kompatibel dengan *Rhizobium*.

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.