

## Karakterisasi *Pseudomonas fluorescens* B29 dan B39: Profil DNA Genom, Uji Hipersensitivitas, dan Asai Senyawa Bioaktif

### (Characterization of *Pseudomonas fluorescens* B29 and B39: Genomic DNA Profile, Hypersensitivity Test, and Assay of Bioactive Compound)

ANTONIUS SUWANTO<sup>1</sup>\*, HENNY FRISKA<sup>1</sup>, DAN IDWAN SUDIRMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas MIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 1 Maret 1996/Disetujui 7 Mei 1996

Isolates of *P. fluorescens* B29 and *P. fluorescens* B39 were able to inhibit the growth of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines in planta*. DNA profile analysis employing Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) demonstrated that *P. fluorescens* B29 was different from *P. fluorescens* B39 and both were distinguishable from *P. fluorescens* A506 (a commercial biocontrol strain) or *P. fluorescens* ATCC13525. *Pseudomonas fluorescens* B29 and B39 were unable to induced hypersensitive responses in tobacco leaf, which might suggest that these bacteria were not plant pathogens. *Pseudomonas fluorescens* B29 and B39 did not excrete bioactive compound which presumably responsible for the inhibition of *X. campestris* pv. *glycines* growth in *planta*. The inhibition activity against *X. campestris* pv. *glycines in planta*, might be due to the epiphytic fitness of *P. fluorescens* B29 and B39 as biocontrol agents. Apparently, these bacteria served as superior competitors in nutrition resource depletion or in the colonization of the same ecological niche of soybean phyllosphere.

#### PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L.) adalah salah satu bahan pangan penting di Indonesia. Kebutuhan kedelai yang terus meningkat belum dapat dipenuhi oleh produksi dalam negeri. Rendahnya produksi kedelai di Indonesia antara lain disebabkan oleh hama dan penyakit tanaman. Bisul bakteri (*bacterial pustule*) merupakan penyakit penting pada kedelai yang disebabkan oleh *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. Menurut klasifikasi terbaru berdasarkan genotipenya, patogen ini diusulkan sebagai *X. axonopodis* pv. *glycines* (Vauterin *et al.*, 1995). Gejala penyakit pada daun terlihat sebagai bercak kecil berwarna hijau kekuningan dengan bagian tengah agak menonjol (Semangun, 1991).

Penanggulangan penyakit dengan menggunakan antibiotik dan senyawa kimia telah dilaporkan sebagai salah satu penyebab kerusakan lingkungan atau resistensi bakteri patogen (Burgess dan Hussey, 1971; Sivan dan Chet, 1993). Oleh karena itu penggunaan bahan hayati sebagai agen pengendali penyakit tanaman merupakan salah satu alternatif yang perlu dipertimbangkan.

Biokontrol dapat didefinisikan sebagai penggunaan organisme hidup untuk memodifikasi ekosistem pertanian, untuk mengendalikan penyebab penyakit tanaman, atau untuk men-

cegah timbulnya ledakan hama (Dowling dan O'Gara, 1994). Keuntungan dalam menggunakan biokontrol antara lain: (i) organisme yang dipakai lebih aman daripada berbagai bahan kimia proteksi yang sekarang digunakan, (ii) tidak terakumulasi dalam rantai makanan, (iii) adanya proses reproduksi sehingga dapat mengurangi pemakaian berulang-ulang, dan (iv) dapat dipakai untuk pengendalian secara bersama-sama dengan cara proteksi yang telah ada (Suwanto, 1994b).

Mikrob spesifik yang dapat mengendalikan beberapa penyakit tanaman seperti *Pseudomonas fluorescens* A506 dikenal dengan merk dagang "Frostban" telah diaplikasikan dalam industri pertanian di Amerika Serikat (Wilson dan Lindow, 1994). Mariani (1995) telah melaporkan adanya beberapa bakteri filosfer daun yang berpotensi sebagai agen biokontrol bagi *X. campestris* pv. *glycines* yaitu bakteri biokontrol B29, B30 dan B39. Tahapan penting setelah isolasi dan seleksi bakteri berpotensi dari lingkungan alaminya ialah menguji sifat patogenisitasnya, sifat fisiologi dan biokimia, aktivitas nukleasi es dan deteksi produksi senyawa bioaktif (Klement, 1990a). Karakterisasi bakteri dengan menggunakan analisis genetika pada umumnya bersifat konsisten dan tidak dipengaruhi oleh faktor fisiologi atau lingkungan. Dalam penelitian ini digunakan analisis profil DNA genom dengan metode skizotaipting (*schizotyping*) (Suwanto, 1994a) untuk melihat perbedaan

\* Penulis untuk korespondensi

genetika antara isolat B29, B39, dan *P. fluorescens* A506. Skizotaiping dipilih karena lebih diskriminatif bila dibandingkan dengan analisis profil DNA lainnya, sehingga dapat diandalkan untuk membedakan galur-galur bakteri yang secara morfologi dan fisiologi tidak dapat dibedakan (Suwanto, 1994a).

Mekanisme penghambatan oleh biokontrol selain melalui kompetisi nutrisi atau lingkungan fisik yang terbatas juga dapat disebabkan adanya senyawa bioaktif yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Menurut O'Sullivan dan O'Gara (1992) mekanisme supresi *Pseudomonas* spp. terhadap patogen penyebab penyakit diantaranya terjadi melalui kompetisi nutrisi, produksi antibiotik, HCN, dan siderofor (protein pengelat besi). Hal yang penting dalam mempelajari produksi senyawa bioaktif ialah metode asai yang dapat diandalkan serta optimasi tahapan dalam pemurnian senyawa bioaktif (Shaw, 1981). Salah satu metode asai yang telah digunakan untuk mendeteksi aktivitas senyawa bioaktif secara *in vitro* ialah dengan difusi sumur agar (Mathieu *et al.*, 1993; Sudirman *et al.*, 1993).

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan karakter bakteri isolat B29 dan B39 dengan (i) menganalisis perbandingan profil DNA genom, (ii) mengetahui sifat patogenisitas bakteri biokontrol melalui uji hipersensitivitas, dan (iii) asai senyawa bioaktif untuk mendeteksi aktivitas antibakterinya terhadap *X. campestris* pv. *glycines*.

## BAHAN DAN METODE

**Identifikasi Bakteri.** Isolat B29 dan B39 diidentifikasi berdasarkan hasil uji fisiologi dengan perangkat API-20-NE (bioMerieux, Perancis).

### Analisis Profil DNA Genom

**Isolasi dan Pemotongan DNA Genom Total.** Isolat bakteri yang digunakan ialah isolat *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* ATCC25416, *P. putida* ATCC12633, *P. syringae* Cit7, *P. fluorescens* ATCC13525, *P. fluorescens* A506, bakteri biokontrol isolat B29, B39, dan B30 (Mariani, 1995), serta *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 sebagai standar ukuran molekul DNA genom (Suwanto dan Kaplan, 1989). Masing-masing bakteri dikulturkan pada media kaldu Luria-Bertani (LB) pada suhu 30°C selama 24 jam. Ke dalam suspensi bakteri ditambahkan 10 µg/ml kloramfenikol dan diinkubasi selama 15-30 menit sebelum pemanenan untuk sinkronisasi replikasi DNA. Sebanyak 1.5 ml kultur bakteri disentrifugasi (7000 rpm, 5 menit), kemudian dicuci dengan larutan PIV (10 mM Tris-Cl, pH 7.5; 1M NaCl) dan disentrifugasi pada kondisi yang sama, disuspensikan kembali dalam 0.5 ml larutan PIV dan dicampurkan dengan 0.5 ml *low-melting point agarose* (LMA) 1.5% dalam 1 x TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA; pH 8). Campuran dituang ke lubang cetakan 20 mm x 10 mm x 1 mm dan dibiarkan memadat. Sel bakteri dalam blok agar direndam dalam larutan EC-lysis (Smith dan Cantor, 1987) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan penggoyangan lemah. Selanjutnya larutan diganti dengan larutan ESP dengan 200 µg/ml proteinase K dan diinkubasi pada suhu 52°C selama 48 jam dengan penggoyangan lemah (Rosana *et al.*, 1995; Rukayadi, 1995). Blok agar lalu dicuci dengan larutan 1 x TE selama dua jam sebanyak tiga kali pada suhu 37°C dengan penggoyangan lemah. Blok agar disimpan pada

suhu 4°C. Pemotongan DNA genom dilakukan berdasarkan Suwanto dan Kaplan (1989) dengan menggunakan enzim restriksi *SpeI*.

**Elektroforesis Gel Medan Berpulsa.** Gel pelari (*running gel*) dibuat dari 100 ml *high-melting point agarose* 1% dalam 0.5 x TBE (50 mM Tris-borat bufer; 0.1 mM EDTA) berukuran 14 cm x 12 cm x 1 cm. Blok agar hasil digesti dimasukkan dalam sumur gel dan ditutup dengan 1.5% LMA dalam 1 x TE. Pemisahan DNA dilakukan dalam piranti PFGE, CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*) DRII System (BioRad) dengan bufer 0.5 x TBE. Temperatur bufer selama pemisahan diatur pada suhu 14°C. Gel hasil pemisahan diwarnai dengan etidium bromida (1 µg/ml) selama 20-30 menit dan dibilas dengan akuades selama 30 menit kemudian didokumentasi di bawah UV transluminasi (280 nm) dengan kamera polaroid (Hoefer's Photoman). Untuk standar ukuran molekul DNA digunakan *R. sphaeroides* 2.4.1 yang dipotong dengan enzim restriksi *Asel* (Suwanto dan Kaplan, 1989).

**Uji Hipersensitivitas.** Uji patogenisitas bakteri yang baru diisolasi dari lingkungan alamnya dilakukan dengan melihat respons hipersensitivitas tanaman indikator terhadap bakteri tersebut. Pengujian mengikuti metode Lelliot dan Stead (1987). Bakteri yang digunakan ialah isolat B29, B30, B39 dan *P. fluorescens* A506. *Pseudomonas syringae* Cit7 digunakan sebagai kontrol positif sedangkan untuk kontrol negatif digunakan *E. coli* DH5  $\alpha$  (Sambrook *et al.*, 1989). *Pseudomonas syringae* Cit7 telah diketahui merupakan patogen pada jeruk (Wilson dan Lindow, 1994). Tembakau (*N. tabacum* var. Samsun M.N.) digunakan sebagai tanaman indikator dalam penelitian ini.

Koloni bakteri dari media padat disuspensikan dalam akuades steril dengan kepadatan sel  $10^7$ - $10^8$  sel/ml kemudian diinjeksikan menggunakan *hypodermic syringe* yang steril ke dalam mesofil daun tembakau. Tanaman yang telah diinokulasi, diinkubasi selama 16-24 jam pada suhu 28-30°C. Respons hipersensitivitas ditunjukkan dengan terjadinya pencoklatan daun pada daerah injeksi bakteri yang diakibatkan karena kematian lokal jaringan daun (nekrosis).

**Deteksi Senyawa Bioaktif.** Deteksi senyawa bioaktif dilakukan terhadap bakteri indikator *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Xcg) 8Ra, Xcg 1FL, dan Xcg YR32 (Rukayadi, 1995) mengikuti Sudirman *et al.* (1993) menggunakan metode asai difusi sumur agar.

**Penyediaan Supernatan Bebas Sel.** Bakteri biokontrol dikulturkan pada media kaldu LB, King's B 10%, dan Sistrom pada suhu 28-30°C selama 24, 48, dan 72 jam. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan disaring menggunakan milipor dengan diameter pori 0.22 µm. Untuk mendapatkan konsentrasi komponen bioaktif yang lebih tinggi, 200 ml supernatan bebas sel dipekatkan sebanyak 20 kali hingga volume akhir menjadi 10 ml dengan evaporasi pada suhu 28-30°C menggunakan evaporator putar (Heidolph).

**Deteksi Senyawa Bioaktif.** Bakteri indikator Xcg dikulturkan pada media kaldu LB selama 24 jam pada suhu 28-30°C dengan kepadatan  $10^6$ - $10^7$  sel/ml. Sebanyak 1% suspensi bakteri tersebut dicampur dengan 99% media agar LA cair (suhu 45-50°C), lalu dituang dalam cawan Petri. Setelah memadat dibuat sumur berdiameter 7 mm. Masing-masing

sumur diisi dengan supernatan bebas sel sebanyak 100, 150, dan 200  $\mu$ l dan untuk kontrol negatif digunakan supernatan bebas sel dari *E. coli* DH5  $\alpha$ . Kontrol positif dilakukan dengan menambahkan 100  $\mu$ l tetrasiklin (1  $\mu$ g/ml), dan ini hanya dilakukan pada penelitian pendahuluan untuk melihat terbentuknya zona bening (daerah hambatan) di sekitar sumur. Prainkubasi dilakukan pada suhu 4°C dan supernatan dibiarkan berdifusi ke dalam agar selama empat jam. Selanjutnya inkubasi dilakukan pada suhu pertumbuhan bakteri indikator (28-30°C). Terbentuknya zona hambatan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari senyawa bioaktif dalam supernatan

## HASIL

**Identifikasi Bakteri.** Isolat B29 dan B39 merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek. Hasil identifikasi bakteri menggunakan perangkat identifikasi API 20 NE (bio-Merieux, Perancis) berdasarkan sifat fisiologinya menunjukkan bahwa bakteri biokontrol B29 dan B39 merupakan *Pseudomonas fluorescens* (Tabel 1).

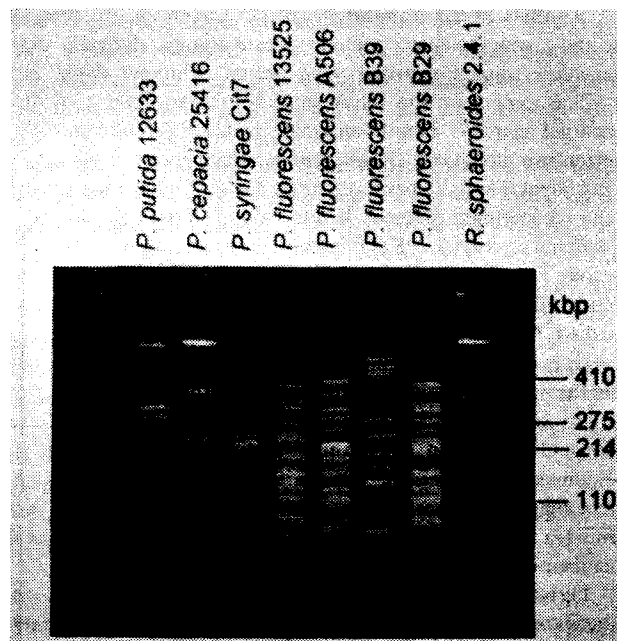
Tabel 1. Ciri-ciri fisiologi bakteri isolat B29 dan B39 berdasarkan hasil uji dengan perangkat API 20 NE (bioMerieux, Perancis) yang menunjukkan bahwa isolat B29 dan B39 adalah galur *Pseudomonas fluorescens*

Substrat	Reaksi/Enzim	Bakteri Isolat	
		B29	B39
KNO <sub>3</sub>	reduksi NO <sub>3</sub> $\rightarrow$ NO <sub>2</sub>	-	+
Triptofan	produksi indol	-	-
Glukosa	asidifikasi	-	-
Arginin	arginin dihidrolase	+	+
Urea	urease	-	-
Esculin	hidrolisis ( $\beta$ -glukosidase)	-	-
Gelatin	hidrolisis (protease)	+	+
p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranosida	$\beta$ -galaktosidase	-	-
Glukosa	asimilasi	+	+
Arabinosa	asimilasi	-	-
Manosa	asimilasi	+	+
Manitol	asimilasi	+	+
N-asetil-glukosamin	asimilasi	+	+
Maltosa	asimilasi	-	-
Glukonat	asimilasi	+	+
Kaprat	asimilasi	+	+
Adipat	asimilasi	-	-
Malat	asimilasi	+	+
Sitrat	asimilasi	+	+
Fenil asetat	asimilasi	+	+
Tetrametil-p-fenilan diamin	oksidasi sitokrom	+	+

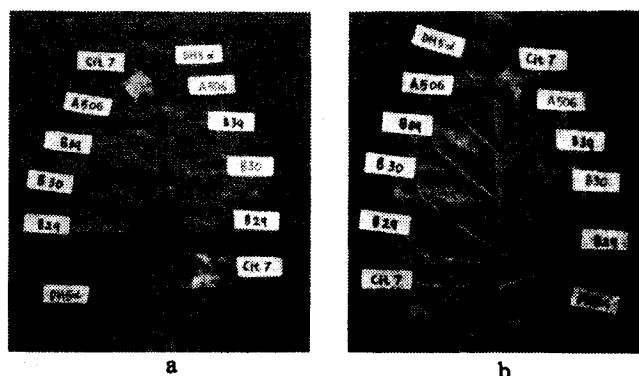
+ = reaksi positif, - = reaksi negatif

**Analisis Perbandingan Profil DNA Genom.** DNA genom *Pseudomonas* sp. yang dipotong dengan enzim restriksi *SpeI* menghasilkan sedikitnya 16-18 potong fragmen DNA yang tersebar merata. *Pseudomonas fluorescens* B29 menghasilkan sedikitnya 17 potong fragmen dengan ukuran fragmen yang terbesar kira-kira 369 kpb sedangkan *P. fluorescens* B39 menghasilkan sedikitnya 16 fragmen DNA dengan ukuran fragmen terbesar kira-kira 425 kpb (Gambar 1).

**Uji Hipersensitivitas.** Hasil uji hipersensitivitas menunjukkan bahwa kedua agen biokontrol B29 dan B39 tidak mendorong respons hipersensitif yang menyebabkan nekrosis jaringan daun tembakau (Gambar 2).



Gambar 1. Hasil pemisahan DNA genom dengan enzim restriksi *SpeI* pada kondisi rapping: waktu pulsa 5-50 detik, waktu running 18 jam, tegangan listrik 175 V, pada gel agarosa 1%, standar ukuran molekul *R. sphaeroides* 2.4.1 dipotong dengan enzim restriksi *AseI*.



Gambar 2. Reaksi hipersensitivitas pada daun tembakau (*Nicotiana tabacum* var. Samsun M.N.) terhadap isolat bakteri B29, B39 dan B30. Pengamatan dilakukan 18 jam setelah inokulasi: a. bagian atas daun, b. bagian bawah daun.

**Deteksi Senyawa Bioaktif.** Deteksi senyawa antimikrob yang dihasilkan bakteri biokontrol isolat B29 dan B39 pada umur 24, 48, dan 72 jam terhadap tiga macam galur bakteri indikator (*Xcg* 8Ra, *Xcg* 1Fl dan *Xcg* YR32) tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya zona hambatan di sekitar sumur supernatan walaupun konsentrasi supernatan bebas sel dipekatkan sebanyak 20 kali tetap tidak teramati adanya aktivitas penghambatan. Supernatan bebas sel sebelum dan sesudah dipekatkan mempunyai kisaran pH antara 6.8-7.0.

## PEMBAHASAN

**Analisis Perbandingan Profil DNA Genom.** Analisis DNA genom menggunakan metode skizotaiping diawali dengan penentuan enzim restriksi yang sesuai sehingga dapat menghasilkan potongan pita DNA yang berukuran besar dan diskrit pada gel agarosa. Pemilihan enzim restriksi ditentukan oleh: (i) persentase mol (G+C) DNA genom organisme, (ii) jumlah basa yang dapat dikenali enzim restriksi, dan (iii) situs enzim restriksi yang memotong sekuen kodon akhir tertentu (Smith dan Condemine, 1990). Kandungan persentase mol (G+C) DNA genom *Pseudomonas* sp. pada umumnya 59-68%, sedangkan untuk DNA genom *P. fluorescens* sendiri mengandung 59.4-61.3% mol (G+C) (Starr et al., 1981). Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan enzim restriksi yang mempunyai situs pengenalan yang kaya nukleotida A (adenin) dan T (timin) seperti *SpeI* (5' A/CTAGT 3') dan mencakup sekuen TAG yang menyandikan kodon akhir yang relatif jarang ditemukan pada kelompok *Pseudomonas* seperti terlihat pada Gambar 1. *SpeI* memotong DNA genom galur-galur *Pseudomonas* dengan jarang sehingga dapat diperoleh pita-pita DNA yang terpisah jelas dan membentuk profil DNA yang khas.

Perbedaan antar galur dilihat dari jumlah pita yang dihasilkan dan jarak migrasi fragmen DNA. Hasil penelitian ini dengan jelas memperlihatkan perbedaan yang nyata antara *P. fluorescens* B29 dengan *P. fluorescens* B39 dan antara masing-masing isolat tersebut dengan galur *Pseudomonas* lainnya. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa *P. fluorescens* B29 dan *P. fluorescens* B39 merupakan organisme yang berbeda secara genetika. Kedua bakteri tersebut juga berbeda secara genetika dengan bakteri biokontrol komersial Frostban B (*P. fluorescens* A506) atau dengan *P. fluorescens* ATCC13525. Perbedaan yang sangat dramatis juga diperlihatkan antara *P. fluorescens* B29 dan B39 dengan spesies-spesies *Pseudomonas* lainnya (Gambar 1). Pola pita DNA genom yang dihasilkan oleh masing-masing organisme sangat khas, meskipun keempat galur *P. fluorescens* tersebut secara fisiologi sulit dibedakan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa skizotaiping dapat dipakai untuk pencirian galur lebih jelas dan andal dibandingkan dengan pencirian secara fisiologi atau morfologi. Karakteristik fisiologi *P. fluorescens* B29 dan *P. fluorescens* B39 menunjukkan ciri yang hampir serupa (Tabel 1). Perbedaannya hanya pada kemampuan *P. fluorescens* B39 mereduksi substrat  $\text{NO}_3^-$  menjadi  $\text{NO}_2^-$ , sedangkan *P. fluorescens* B29 tidak mampu melakukan reaksi tersebut. Kedua bakteri tersebut juga sulit dibedakan dari morfologi selnya. Tetapi bila dilihat dari pola profil DNA genomnya

(skizotipe), kedua galur tersebut mempunyai ciri-ciri yang sangat berbeda.

Perbedaan hasil skizotaiping menunjukkan perbedaan struktur genom antargalur *Pseudomonas* yang diuji, termasuk antargalur dari spesies yang sama (*P. fluorescens*). Perbedaan ini dapat terjadi karena perubahan pada genom yang diakibatkan karena penataan kembali pada DNA (plasmid atau kromosom) yang diakibatkan proses lesapan, penyisipan, translokasi, inversi atau amplifikasi. Proses ini merupakan hal yang sering terjadi pada genom mikrob dan bahkan merupakan bagian dari daur hidup beberapa mikroorganisme. Penataan kembali pada genom berperan penting dalam keragaman karakter fisiologi, serologi atau patogenisitas dan juga dalam menentukan kondisi kebugaran dan kemampuan hidup beberapa jenis bakteri (Suwanto, 1994a).

**Uji Hipersensitivitas.** Salah satu syarat bahan hayati sebagai agen pengendali ialah bersifat aman bagi tanaman inang dan lingkungannya. Setelah tahap isolasi, sangat penting mengetahui sifat patogenisitas bakteri tersebut untuk menentukan kemungkinan penggunaan bakteri ini lebih lanjut. Untuk melihat patogenisitas organisme biokontrol, dalam penelitian ini dilakukan uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau. Jika organisme biokontrol bersifat patogen, daun tembakau akan memberikan respons hipersensitif dengan menampilkan luka bekas suntikan yang berwarna coklat dan kering akibat nekrosis. Respons hipersensitif diartikan sebagai reaksi pertahanan yang cepat dari tanaman menghadapi patogen yang tidak kompatibel disertai dengan kematian sel yang cepat pada jaringan di daerah yang diinjeksi suspensi bakteri (Klement, 1990b).

Bakteri biokontrol *P. fluorescens* B29 dan B39 tidak mendorong terjadinya respons hipersensitivitas. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa bakteri biokontrol tersebut bukan bakteri patogen tanaman. Sebaliknya, respons hipersensitif terjadi pada jaringan daun yang diinjeksi dengan *P. syringae* Cit7 yang dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif. Galur-galur *P. fluorescens* memang pada umumnya bukan patogen tanaman dan hanya dilaporkan sebagai saproba atau patogen pada hewan (Starr et al., 1981). Galur *P. fluorescens* justru banyak digunakan sebagai biokontrol hayati patogen tanaman (O'Sullivan dan O'Gara, 1992).

Respons hipersensitivitas merupakan hasil reaksi yang stabil antara organisme patogen dengan sel inang tanaman pada kondisi yang optimum dalam laboratorium (Klement, 1990b), sehingga pengujian tersebut dilakukan secara *in vitro* dalam kondisi yang optimum bagi tanaman maupun bakteri yang diuji. Selain itu, tanaman tembakau yang diinjeksi *Pseudomonas* sp. harus diinkubasi pada suhu tidak lebih dari 30°C karena *Pseudomonas* sp. agak terhambat pertumbuhannya pada suhu di atas 30°C (Lelliot dan Stead, 1987). Lamanya evaporasi bergantung pada kondisi lingkungan seperti suhu dan kelembaban udara serta keadaan fisiologi tanaman.

**Deteksi Senyawa Bioaktif.** Mikroorganisme tertentu memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol antara lain karena aktivitas antimikrob atau antibiotik yang dihasilkan. Produksi metabolisme mikrob secara *in situ* tidak selalu sama dengan yang dihasilkan pada kondisi laboratorium. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi kinetika dari produksi metabolit, kondisi kultur, nutrisi, dan faktor lingkungan (Shaw, 1981). Pengulturan *P. fluorescens* B29 dan B39 pada penelitian ini menggunakan kondisi umur

kultur 24, 48 dan 72 jam, dengan penggoyangan serta ditumbuhkan pada suhu optimum untuk pertumbuhan *Pseudomonas* (28-30°C). Umumnya produksi toksin maksimum terjadi pada kisaran suhu pertumbuhan optimum juga (Shaw, 1981). Untuk melihat pengaruh nutrisi terhadap produksi bahan antimikrob digunakan tiga macam media kaldu yaitu Luria-Bertani (LB), King's B 10% (Mariani, 1995), dan media Sistrom (Lueking *et al.*, 1978). Pertumbuhan bakteri dilakukan dalam media cair, karena kondisi ini lebih banyak dipilih untuk produksi metabolit yang disekresikan dari dalam sel ke media kultur. Selain itu juga pertumbuhan bakteri pada media padat relatif lebih terbatas dan dapat menyebabkan penurunan produksi toksin antara lain karena degradasi (Shaw, 1981).

Komposisi media kultur mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme serta kemampuannya menghasilkan komponen yang diinginkan. Kondisi optimum untuk keduanya mungkin tidak sama. Pertimbangan penting lainnya ialah kinetika produksi senyawa bioaktif. Kebanyakan komponen bioaktif diproduksi pada akhir fase eksponensial atau memasuki fase stasioner dan juga selama fase stasioner. Oleh karena itu dalam penelitian ini supernatan kultur yang diuji dilakukan dengan waktu pemanenan yang bervariasi.

Tidak terdeteksinya senyawa antimikrob melalui aktivitas antibakteri biokontrol terhadap *X. campestris* pv. *glycines* (*Xcg*) dapat disebabkan karena tidak terekspresinya senyawa antibakteri pada semua kondisi asai yang dicobakan. Pada media kaldu King's B yang merupakan media standar untuk melihat fluoresensi dari galur *Pseudomonas* sp. tidak terlihat adanya aktivitas antimikrob. Hal ini dapat berarti senyawa kuning berfluoresen yang teramati oleh peneliti terdahulu (Mariani, 1995) tidak bertanggung jawab terhadap mekanisme penghambatan *Xcg* *in vitro*. Demikian juga penggunaan media Sistrom yang mengandung EDTA (0.1765%), suatu senyawa pengkelat logam, tidak memberikan hasil positif. Dari penggunaan media Sistrom ini diharapkan bila terdapat siderofor akan dapat diekspresikan, karena dengan adanya EDTA akan sangat menurunkan konsentrasi ion  $Fe^{3+}$  dalam media.

Hasil analisis supernatan bebas sel menyarankan bahwa isolat *P. fluorescens* B29 dan B39 tidak menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan *Xcg* atau, kalau pun menghasilkan senyawa bioaktif, tidak diekspresikan pada kondisi asai *in vitro*. Oleh karena itu, interaksi yang terjadi kemungkinan besar disebabkan oleh kemampuan epifit *P. fluorescens* B29 dan B39 yang besar dan sebagai kompetitor bagi *Xcg* kompetisi nutrisi/substrat dan situs hidup yang sama, sehingga pertumbuhan patogen pada daun menjadi lebih terkendali.

Kemampuan epifit bakteri filosfer diartikan sebagai kemampuan bakteri untuk tumbuh dan/atau bertahan hidup di lingkungan daun yang cenderung tidak menguntungkan bagi pertumbuhan mikroorganisme pada umumnya, antara lain karena secara alami permukaan daun sering mengalami fluktuasi suhu, radiasi, serta kelembaban yang berubah cepat dan drastis. Meskipun demikian, beberapa jenis mikroorganisme secara alami dapat hidup dengan baik di daun. Karena kemampuan bertahan dan beradaptasi sebagai epifit pada lingkungan yang mempunyai cekaman kondisi lingkungan yang berubah drastis dan sinambung, maka mikrob epifit nonpatogen telah banyak

dipelajari kemungkinan potensinya sebagai agen biokontrol bagi patogen tanaman.

Bakteri dari spesies yang berbeda sering terdapat bersama-sama di daun. Bila spesies-spesies ini menempati mikrohabitat yang sama maka kemampuan bertahan suatu bakteri bergantung pada kemampuannya bersaing dan/atau kemampuannya untuk hidup bersama dengan menggunakan sumber nutrisi dan situs yang berbeda dengan yang lain (Wilson dan Lindow, 1994). Profil penggunaan nutrisi yang luas pada bakteri epifit akan meningkatkan potensi organisme tersebut untuk bertahan terhadap keberadaan organisme lain.

Bakteri biokontrol *P. fluorescens* B29, B30, dan B39 telah diketahui mampu mengendalikan pertumbuhan *Xcg* pada daun kedelai *in planta* melalui deteksi aktivitas nukleasi es dengan analisis de Witt (Mariani, 1995). Penelitian ini menunjukkan bahwa kemampuan tersebut mungkin disebabkan terutama karena memperebutkan sumber nutrisi dan situs ekologi yang sama.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat B29 dan B39 adalah galur *Pseudomonas fluorescens* dan dari hasil karakterisasinya dapat disimpulkan: Berdasarkan profil DNA genomnya, *P. fluorescens* B29 dan *P. fluorescens* B39 merupakan galur yang berbeda. Kedua bakteri tersebut juga berbeda dengan *P. fluorescens* A506 atau galur *Pseudomonas* lain yang diuji. Pengujian hipersensitivitas menunjukkan bahwa kedua isolat hampir dapat dipastikan bukan bakteri patogen tanaman. *Pseudomonas fluorescens* B29 dan B39 tidak menghasilkan senyawa bioaktif *in vitro*, sehingga kemampuan biokontrolnya untuk *Xcg* *in planta* mungkin disebabkan karena kompetisi nutrisi atau kolonisasi pada habitat yang sama.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari dana Riset Unggulan Terpadu (RUT-I) kepada Antonius Suwanto melalui Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia dengan nomor kontrak 1021/SP-KD/PPIT/IV/95.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Burges, H.D. and N.W. Hussey. 1971. *Microbial Control of Insect and Mites*. London: Academic Press.
- Dowling, D.N. and F. O'Gara. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* Involved in the Biocontrol of Plant Disease. *TibTech*. 12:133-141.
- Klement, Z. 1990a. Inoculation of Plant Tissue, p. 95-124. In Z. Klement (ed.), *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akademiai Kiado.
- Klement, Z. 1990b. Mechanism of Resistance, p. 469-493. In Z. Klement (ed.), *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akademiai Kiado.
- Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants*. London: Blackwell Scientific Publication.
- Lueking, D.R., R.T. Fraley, and S. Kaplan. 1978. Intracytoplasmic Membrane Synthesis in Synchronous Cell Populations of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J.Biol. Chem.* 253:451-457.

- Mariani.** 1995. Isolasi dan Seleksi Bakteri Filosfer yang Berpotensi untuk Biokontrol *X. campestris* pv. *glycines* 8Ra pada Tanaman Kedelai dengan Esei Nukleasi Es. Skripsi. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Mathieu, F., I.S. Suwandhi, N. Rekhif, J.B. Milliere, and G. Lefebvre.** 1993. Mesenterosin 52, a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *J. Appl. Bacteriol.* 74:372-379.
- O'Sullivan, D.J. and F. O'Gara.** 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiol. rev.* 58:662-3770.
- Rosana, L., A. Suwanto, B. Tjahjono dan E. Guhardja.** 1995. Profil DNA Genom *Xanthomonas campestris* dengan Menggunakan Schizotyping. *Hayati* 2:28-33.
- Rukayadi, Y.** 1995. Analisis Profil DNA Genom Sejumlah Isolat *X. campestris* pv. *glycines* dengan Menggunakan Elektroforesis Gel Medan Berpuls (pulsed-field gel electrophoresis). Tesis. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Semangun, H.** 1991. *Penyakit-penyakit Tanaman Pangan di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Shaw, P.D.** 1981. Production and Isolation, p.21-44. *In Toxins in Plant Disease*. New York: Academic Press, Inc.
- Sivan, A. and I. Chet.** 1993. Microbial Control of Plant Diseases, *In* R. Mitchell (ed.), *Environmental Microbiology*. New York: John Wiley & Son, Inc.
- Smith, C.L. and C.R. Cantor.** 1987. Purification, Specific Fragmentation, and Separation of Large DNA Molecules. *Method in Enzymol.* 155: 449-467.
- Smith, C.L. and G. Condemine.** 1990. New Approaches for Physical Mapping of Small Genomes. *J. Bacteriol.* 172:1167-1171.
- Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel.** 1981. *The Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag.
- Sudirman, I., F. Mathieu, M. Michel, and G. Lefebvre.** 1993. Detection and Properties of Curvaticin 13, a Bacteriosin-like Substance Produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Curr. Microbiol.* 27:35-40.
- Suwanto, A. and S. Kaplan.** 1989. Physical and Genetic Mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Genome: Genome Size, Fragment Identification and Gene Localization. *J. Bacteriol.* 171:5840-5849.
- Suwanto, A.** 1994a. Pulsed-Field Gel Electrophoresis: A Revolution in Microbial Genetics. *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 2:78-85.
- Suwanto, A.** 1994b. Mikroorganisme untuk Biokontrol: Strategi Penelitian dan Penerapannya dalam Bioteknologi Pertanian. *Agrotek.* 2:40-46.
- Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters, and J. Swings.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:472-489.
- Wilson, M. and S.E. Lindow.** 1994. Ecological Similarity and Coexistence of Epiphytic Ice-nucleating (Ice<sup>+</sup>) *P. syringae* Strain and a Non-ice-nucleating (Ice<sup>-</sup>) Biological Control Agent. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3128-3137.