

**PEMANFAATAN *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* DALAM
PENGENDALIAN HAYATI *Ralstonia solanacearum* PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI
PADA TOMAT**

**UTILIZATION OF *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* IN BIOLOGICAL
CONTROL OF *Ralstonia solanacearum* THE CAUSE OF BACTERIAL WILT DISEASE IN
TOMATO**

Istiqomah dan Dian Eka Kusumawati

Universitas Islam Darul 'Ulum Lamongan, Jalan Airlangga 03 Sukodadi, Lamongan, Jawa Timur

Korespondensi : istiqomah@unisda.ac.id / istiqomah.faqih@gmail.com

Diterima 4 April 2018 / Disetujui 26 Juni 2018

ABSTRAK

Salah satu penyakit penting pada produksi tomat di Indonesia adalah layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*. Alternatif untuk mengendalikan penyakit layu bakteri adalah dengan menggunakan *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kemampuan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dalam mengendalikan penyakit layu bakteri yang disebabkan *R. solanacearum* serta mekanisme penghambatannya. Penelitian ini terdiri dari 5 tahap, yaitu perbanyakan inokulum *R. solanacearum*, uji virulensi dan uji hipersensitif *R. solanacearum*, uji antagonis *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap *R. solanacearum* pada media agar, uji jenis antibiosis, penelitian di rumah kaca, dan analisis total fenol. Hasil penelitian uji antagonis menunjukkan bahwa semua isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* memiliki potensi menghambat *R. solanacearum* dengan tipe antibiosis bakteriostatik. Hasil analisis kadar fenol menunjukkan bahwa terjadi peningkatan total fenol secara signifikan pada tanaman tomat yang diaplikasikan isolat *B. subtilis* UB-ABS6, *P. fluorescens* UB-PF5 dan *P. fluorescens* UB-PF6. Penelitian di rumah kaca menunjukkan bahwa semua tanaman tomat yang diaplikasikan agens hayati mengalami penundaan masa inkubasi dibandingkan dengan kontrol. Isolat *B. subtilis* UB-ABS2, *B. subtilis* UB-ABS6, *P. fluorescens* UB-PF5 dan *P. fluorescens* UB-PF6 secara signifikan menekan kejadian penyakit layu bakteri berturut-turut 50%, 30%, 60%, dan 60%. *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dapat dimanfaatkan untuk mengendalikan layu bakteri pada tomat yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*.

Kata kunci : *Bacillus subtilis*, pengendalian hayati, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia solanacearum*, tomat.

ABSTRACT

One of important disease that infects tomato production in Indonesia is bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Alternative on controlling bacterial wilt is using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. Goal of the research was to find out ability of *B. subtilis* and *P. fluorescens* to control *R. Solanacearum* and mechanism of the inhibition. This

research divided into 5 stages, i.e. propagation of *R. solanacearum*, virulence and hypersensitive tests of *R. Solanacearum*, antagonist test of *B. subtilis* and *P. fluorescens* against *R. solanacearum* on agar medium, antibiosis type test, research in greenhouse, and total phenol analysis. The result showed that all isolates of *B. subtilis* and *P. fluorescens* have potential to inhibit *R. solanacearum* by bacteriostatic antibiosis type. The total phenol level showed significant increase of phenol on tomato along with the application of isolates *B. subtilis* UB-ABS6, *P. fluorescens* UB-PF5 and *P. fluorescens* UB-PF6. Research in the greenhouse showed that all tomatoes, which had been given bioagent, did delay on the incubation than the control. Isolates of *B. subtilis* UB-ABS2, *B. subtilis* UB-ABS6, *P. fluorescens* UB-PF5, and *P. fluorescens* UB-PF6 had significantly inhibited the bacterial wilt disease 50%, 30%, 60%, and 60%, respectively. Therefore, *B. subtilis* and *P. fluorescens* can be used to control bacterial wilt diseases on tomato caused by *Ralstonia solanacearum*.

Keywords : *Bacillus subtilis*, bio-control, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia solanacearum*, tomato.

PENDAHULUAN

Tomat merupakan komoditas hortikultura yang penting di Indonesia dan berperan strategis dalam pemenuhan kebutuhan masyarakat sehari-hari. Selama masa pertumbuhannya, tomat mengalami beberapa kendala budidaya baik dari hama maupun patogen yang dapat menurunkan produksi. Kendala utama dalam meningkatkan produksi tomat adalah serangan hama dan penyakit. Menurut Agrios (2005), kerugian panen akibat penyakit ini diperkirakan sekitar 14% di seluruh dunia.

Salah satu penyakit penting pada tanaman tomat adalah layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*. Di benua Amerika, penyakit ini mampu menurunkan tingkat produksi pada 15% lahan di Carolina Selatan (Agrios, 2005). Menurut Rivard *et al.* (2012), pada lahan yang terinfeksi *R. solanacearum* secara alami di Jerman kejadian penyakit ini mencapai 75%. Patogen *R. solanacearum* mengganggu pengangkutan air dan zat makanan dengan jalan merusak sel tanaman. Enzim yang berperan dalam proses ini adalah enzim selulase dan pektinase. Enzim ini menghancurkan

dinding sel tanaman yang mengandung selulosa dan pektin. Akibat dari serangan ini terjadi penyimpangan fisiologis tanaman yaitu terganggunya proses translokasi air dan nutrisi lainnya sehingga tanaman menjadi layu kemudian mati (Agrios, 2005).

Berbagai upaya telah dilakukan dalam pengendalian penyakit layu bakteri, diantaranya adalah penggunaan benih bebas hama dan penyakit, penanaman jenis tanaman yang tidak sejenis, penanaman yang tidak serempak pada lahan yang luas, dan penggunaan pestisida sintetis, tetapi cara ini belum mendapatkan hasil yang memuaskan. Alternatif pengendalian lain untuk mengendalikan penyakit layu bakteri adalah dengan pengendalian hayati menggunakan mikroba. Penggunaan agens hayati dalam pengendalian penyakit tanaman memiliki beberapa kelebihan diantaranya dapat mengurangi pencemaran lingkungan bahan kimia dari insektisida, lebih efisien, berkelanjutan, tidak merusak keragaman hayati, dan kompatibel dengan cara pengendalian lainnya (Setiati *et al.*, 2016). Bakteri yang dapat berfungsi sebagai agens

hayati adalah *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*.

Bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* telah dikenal secara luas memiliki potensi sebagai agens hayati untuk menghambat beberapa patogen tanaman. *Pseudomonas* spp. adalah kelompok bakteri perakaran yang efektif menekan berbagai penyakit tanaman diantaranya rebah semai, busuk lunak, layu bakteri, dan lain-lain pada banyak varietas tanaman. Zat antibiotik yang diproduksi oleh *Pseudomonas* spp. (2,4-diacetylphloroglucinol / 2,4-DAPG) mampu meningkatkan ketahanan tanah terhadap patogen (Weller *et al.*, 2012). Penelitian Chen *et al.* (2013) yang dilakukan di rumah kaca membuktikan bahwa *B. subtilis* memiliki sifat yang mampu menekan berbagai jenis patogen tanaman dan mampu bertahan pada kondisi lingkungan yang ekstrim.

Kemampuan kedua bakteri ini dalam meningkatkan pertumbuhan dan pengendalian penyakit pada berbagai komoditas telah banyak diteliti, tetapi informasi yang lengkap mengenai potensi dan karakter *B. subtilis* dan *P. fluorescens* sebagai pengendali hayati dalam menekan patogen penyebab penyakit tanaman dan meningkatkan kandungan senyawa pertahanan tanaman (fenol) pada tanaman tomat belum banyak diteliti secara menyeluruh, terutama di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dalam mengendalikan penyakit layu bakteri (*R. Solanacearum*) dan mengetahui mekanisme penghambatannya di laboratorium dan pada tanaman tomat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan dan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Sub Laboratorium Bakteriologi, Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan April – Juli 2017.

Perbanyak Inokulum Patogen *R. solanacearum*, *B. subtilis*, dan *P. fluorescens*

Isolat patogen *R. solanacearum*, *B. subtilis*, dan *P. fluorescens* didapatkan dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Isolat *B. subtilis* yang digunakan adalah kode UB-ABS2 dan UB-ABS6. Isolat *P. fluorescens* yang digunakan adalah kode UB-PF5 dan UB-PF6. Pemurnian bakteri dilakukan dengan *streak* koloni tunggal pada media NA (*Nutrient agar*) kemudian diperbanyak dengan menggoreskan koloni tunggal pada media NA yang baru.

Pengamatan Mikroskopis, Uji Hipersensitif (HR) dan Uji Patogenesis *R. solanacearum*

Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mengidentifikasi isolat *R. solanacearum* termasuk ciri-ciri koloni virulen atau avirulen. Identifikasi dilakukan berdasarkan Champoiseau *et al.* (2009) yaitu ciri-ciri koloni *R. solanacearum* yang virulen adalah setelah 2 hari pada media Kelman's Tetrazolium Chloride (TZC) agar koloni berbentuk besar, bulat tidak teratur, cembung, fluidal dan tepi koloni berwarna putih dengan bagian tengah berwarna merah. Sedangkan koloni yang tidak virulen berbentuk bulat tidak teratur, ukuran lebih

kecil dan berwarna merah keseluruhan. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 4,5x.

Uji HR dilakukan dengan melukai permukaan daun tembakau bagian bawah menggunakan jarum suntik aseptik kemudian suspensi *R. solanacearum* diinfiltrasikan menggunakan spet tanpa jarum suntik. Suspensi yang digunakan adalah biakan murni *R. solanacearum* yang berumur 48 jam dengan kerapatan 10^9 CFU mL⁻¹. Pengamatan dilakukan 24-72 jam setelah inokulasi hingga terjadinya nekrotik pada daun.

Uji patogenesitas dilakukan dengan membuat suspensi biakan murni *R. solanacearum* yang berumur 48 jam kerapatan 10^9 CFU mL⁻¹. Sebanyak 50 mL suspensi bakteri disiramkan pada akar tanaman tomat varietas Permata berumur 1 bulan yang akarnya telah dilukai terlebih dahulu dengan menggunakan pisau aseptik. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap gejala serangan penyakit layu bakteri yang muncul pada tanaman tomat.

Uji Antagonis *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap *R. solanacearum* pada Media Agar

Uji antagonis dilakukan dengan metode pengkabutan menurut Kawaguchi *et al.* (2008). Biakan murni dari semua isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang berumur 48 jam dibuat suspensi hingga kerapatan 10^9 CFU mL⁻¹ dalam akuades steril. Potongan kertas saring steril diameter 5 mm dimasukkan ke dalam suspensi bakteri selama ± 1 menit dan ditiriskan selama 2 jam. Kertas saring yang sudah kering ditanam pada media NA pada cawan Petri yang berdiameter 9 cm dan diinkubasi selama 2 hari. Setelah diinkubasi kemudian diberi khloroform pada tutup cawan Petri

dalam keadaan dibalik selama 1 jam. Setelah itu biakan dikabutkan dengan suspensi bakteri *R. solanacearum* dengan konsentrasi 10^9 CFU mL⁻¹. Pada perlakuan kontrol kertas saring hanya direndam dalam aquades steril. Seluruh perlakuan diinkubasi selama 2 hari dan daerah zona bening diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Uji jenis Antibiosis *B. subtilis* dan *P. fluorescens*

Bagian zona bening di sekitar kertas saring pada hasil uji antagonis diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL media pepton cair 10% kemudian digojlok selama 24 jam. Apabila berubah menjadi keruh maka tipe antibiosisnya adalah bakteristatik. Apabila media tetap jernih maka tipe antibiosisnya adalah bakterisidal (Djarmiko *et al.*, 2007).

Penelitian Rumah Kaca

Media tanam campuran tanah : kompos (1:1) disterilkan menggunakan formalin 4% dan ditutup plastik selama 7 hari. Tanah dikeringanginkan selama 7 hari dan siap digunakan sebagai media tanam. *Polybag* diisi media tanam sebanyak 3 kg dan ditanami bibit tomat varietas Permata yang berumur 14 hari kemudian suspensi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* sebanyak 20 mL (10^9 CFU mL⁻¹) disiramkan ke dalam *polybag*. Inokulasi *R. solanacearum* dilakukan 24 jam setelah aplikasi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* (Huang *et al.*, 2013). Aplikasi dilakukan dengan cara melukai akar tanaman tomat menggunakan pisau aseptik kemudian sebanyak 20 mL suspensi *R. solanacearum* dengan kerapatan 10^9 CFU mL⁻¹ disiramkan di sekitar perakaran yang telah dilukai. Kejadian penyakit dan

efektifitas penekanannya dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kejadian penyakit} = (\text{jumlah tanaman terserang} / \text{total seluruh tanaman}) \times 100$$

Efektifitas penekanan kejadian penyakit = [(kejadian penyakit pada kontrol – kejadian penyakit pada perlakuan)/kejadian penyakit pada kontrol] x 100

Analisis Total Fenol

Sampel yang digunakan untuk analisis total fenol adalah bagian daun tomat. Pengambilan sampel dilakukan 7 HSI (Hari Setelah Inokulasi) *R. solanacearum*. Kandungan total fenol dianalisis berdasarkan metode Folin-Ciocalteu dengan katekol sebagai standar (Sharma *et al.*, 2011). Daun sebanyak 0,5 g diekstraksi dengan nitrogen cair dan 5 mL etanol, hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit, ekstraksi diulangi lagi dengan etanol 80%, perbandingan volume etanol dan hasil ekstraksi adalah 1:1. Supernatan yang dihasilkan dievaporasi hingga kering dalam *waterbath* dengan suhu 78°C. Pada residu yang tersisa ditambahkan akuades hingga mencapai volume 3 mL dan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,5 mL kemudian letakkan pada *waterbath* yang mendidih selama 1 menit. Tabung didinginkan dan hasil dibaca dengan spektrofotometer 650 nm. Larutan standar yang digunakan adalah katekol. Hasil konsentrasi fenol dinyatakan sebagai mg g^{-1} .

Analisis Statistik

Penelitian di laboratorium dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan sedangkan penelitian rumah kaca menggunakan Rancangan Acak Kelompok

(RAK) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Data dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA), jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan menggunakan uji Duncan pada taraf 5%. Pada data yang berbentuk persentase maka terlebih dahulu ditransformasikan menggunakan $\text{arcsin} + 0,5$.

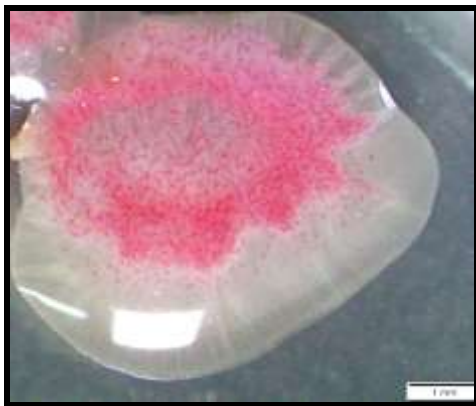
HASIL DAN PEMBAHASAN

Virulensi, daya Hipersensitif (HR) dan Patogenitas *R. solanacearum*

Hasil pengamatan morfologi diperoleh bakteri *R. solanacearum* setelah masa inkubasi berbentuk bulat tidak teratur, berwarna putih keruh, dan terdapat warna merah muda di bagian tengahnya, tepian rata, elevasi cembung, dan mucoid. Berdasarkan hasil pengamatan maka isolat *R. solanacearum* adalah termasuk ciri isolat virulen. Hal ini sesuai dengan pernyataan Champoiseau *et al.* (2009) bahwa ciri koloni virulen memiliki bentuk besar, bulat tidak teratur, cembung, fluidal, dan tepi koloni berwarna putih dengan bagian tengah berwarna merah. Sedangkan koloni yang tidak virulen berbentuk bulat tidak teratur, ukuran lebih kecil, dan berwarna merah keseluruhan. Hasil pengamatan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 1.

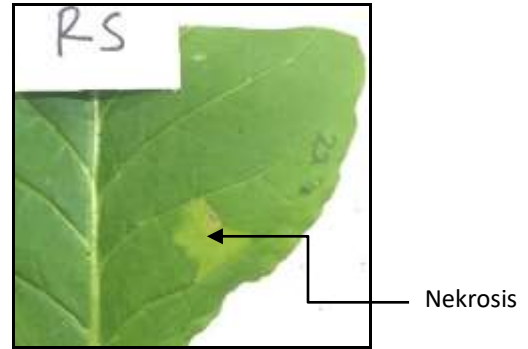
Hasil uji hipersensitif yang dilakukan pada tanaman tembakau berumur 1 bulan menunjukkan adanya reaksi positif terhadap *R. solanacearum*. Suspensi patogen yang diinfiltrasikan pada permukaan bawah daun tembakau menyebabkan daun nekrosis atau menguning. Gejala awal yang muncul adalah jaringan daun tembakau berubah menjadi lebih terang kemudian mengering. Nekrosis muncul pada bagian daun yang di

dalam jaringannya tersebar suspensi *R. solanacearum*. Gejala nekrotik muncul 48-72 jam setelah inokulasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahyudi *et al.* (2011), yang menyatakan bahwa hasil uji hipersensitif positif adalah daun tembakau menjadi kecoklatan pada area masuknya bakteri. Reaksi ini paling jelas teramati 48 jam setelah penyuntikan.



Gambar 1. Koloni *R. solanacearum* pada media TZC dengan perbesaran mikroskop 4,5x

Proses kematian lokal pada jaringan tanaman diawali dengan pengenalan oleh tanaman terhadap sinyal molekuler (elisitor) yang diproduksi oleh patogen. Nukleus bergerak menuju patogen yang menyerangnya dan segera mengalami disintegrasi. Pada saat yang hampir bersamaan butiran yang menyerupai resin berwarna coklat dalam sitoplasma berada di sekitar titik penetrasi patogen dan selanjutnya akan menyebar ke seluruh sitoplasma. Perubahan warna sel menjadi coklat akan terus berlanjut dan kematian sel akan terjadi, akibatnya patogen yang berada dalam sel akan mengalami degenerasi (Abadi, 2003). Hasil pengamatan gejala nekrotik pada uji HR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji hipersensitif pada tembakau yang diinokulasi *R. solanacearum*

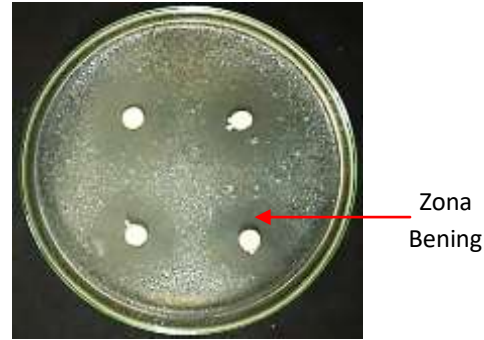
Uji patogenesis dilakukan pada tanaman tomat varietas Permata yang berumur 1 bulan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tanaman tomat terserang gejala penyakit layu bakteri pada 6 hari setelah inokulasi *R. solanacearum*. Gejala penyakit ditandai dengan daun muda tanaman tomat layu permanen selanjutnya layu juga terjadi pada bagian daun yang lain. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Chen *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa tanaman yang terserang layu bakteri mengalami gejala tangkai daun merunduk atau layu kemudian akhirnya tanaman akan mati. Hasil uji patogenesis dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Gejala serangan layu bakteri hasil uji patogenesis ; tanaman tomat sehat pada kontrol (kiri) dan tanaman tomat bergejala layu bakteri (kanan)

Potensi antagonis *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap *R. solanacearum* pada Uji Media Agar

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan pengaruh yang nyata pada uji antagonisme secara *in vitro* antara isolat-isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap *R. solanacearum*. Semua isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* mampu menghasilkan zona bening (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat yang diuji mampu menghambat perkembangan patogen *R. solanacearum*. Pada perlakuan kontrol (akuades) tidak menunjukkan adanya zona bening. Isolat UB-ABS2 dan UB-PF6 menunjukkan aktifitas penghambatan yang sama dengan perlakuan bakterisida streptomycin sulfat 20%. UB-ABS6 menunjukkan aktifitas antagonis yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain (Tabel 1).



Gambar 4. Hasil uji antagonis *B. subtilis* UB-ABS6 terhadap *R. solanacearum* pada media agar. Tanda panah menunjukkan zona bening di sekitar kertas saring.

Tabel 1. Rerata zona bening isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap *R. solanacearum* pada media agar

Perlakuan	Zona bening (mm)	Jenis antibiosis
Bakterisida streptomycin sulfat 20%	21,16 b	-
<i>B. subtilis</i> UB-ABS2	21,25 b	Bakteriostatik
<i>B. subtilis</i> UB-ABS6	23,12 c	Bakteriostatik
<i>P. fluorescens</i> UB-PF5	19,87 a	Bakteriostatik
<i>P. fluorescens</i> UB-PF6	21,38 b	Bakteriostatik

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5%.

Adanya zona bening mengindikasikan bahwa isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* menghasilkan metabolit sekunder yang mampu menghambat atau mematikan patogen. Mekanisme penghambatan bakteri antagonis terhadap patogen dengan cara menghasilkan berbagai senyawa metabolit anti patogen seperti siderofor, kitinase, antibiotik, sianida dan Induksi Ketahanan Sistemik (ISR). Hasil penelitian Soesanto (2008) menyatakan bahwa bakteri antagonis *P. fluorescens* dilaporkan mampu menghasilkan metabolit sekunder antara lain siderofor, pterin, pirol, dan fenazin. Siderofor dapat berperan sebagai fungistasis dan bakteriostatik. Mekanisme penekanan oleh genus *Bacillus* sp. melalui beberapa cara yaitu persaingan/kompetisi, antibiosis, parasitisme dan lisis (Prashar *et al.*, 2013). Chowdhury *et al.* (2015) menyatakan bahwa *B. subtilis* mampu menghasilkan 68 jenis antibiotik dan *B. brevis* memproduksi 23 jenis antibiotik.

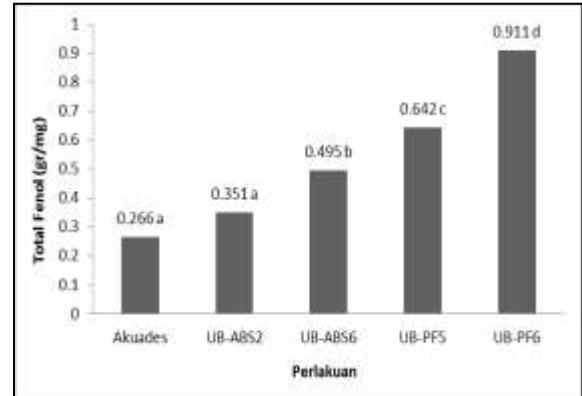
Jenis Antibiosis *B. subtilis* dan *P. fluorescens*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* menghasilkan antibiosis bakteriostatik

(Tabel 1). Larutan pepton yang ditambahkan bagian zona bening berubah menjadi keruh setelah digojlok selama 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa patogen *R. solanacearum* yang telah terhambat pada uji aktifitas antagonis masih mampu tumbuh kembali pada media cair pepton yang mengandung nutrisi dan tidak mengalami kematian permanen yang merupakan ciri antibiosis bakterisidal. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Djatmiko *et al.* (2007) yang menyebutkan bahwa zona hambat pada uji antagonisme terhadap *R. solanacearum* memiliki mekanisme penekanan secara bakteriostatik dan sifat ini dibuktikan dengan larutan pepton berwarna keruh. Bakteriostatik memberikan efek penghambatan tetapi tidak membunuh bakteri patogen. Hasil penelitian Wati *et al.* (2017) menunjukkan bahwa *Bacillus* spp. menghasilkan zona hambat terhadap patogen *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* dengan mekanisme bakteriostatik.

Pengaruh *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap Peningkatan Total Fenol Tanaman Tomat

Hasil analisis aktivitas total fenol menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas fenol terjadi pada tanaman tomat yang diberi perlakuan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* (Gambar 5). Aplikasi *B. subtilis* UB-ABS2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara statistika dengan kontrol. Sementara itu, *B. subtilis* UB-ABS6, *P. fluorescens* UB-PF5, dan *P. fluorescens* UB-PF6 menghasilkan total fenol yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Kandungan total fenol tertinggi dihasilkan oleh *P. fluorescens*.



Gambar 5. Rerata total fenol pada tanaman tomat

Peningkatan total fenol merupakan salah satu indikator pengimbasan ketahanan tanaman oleh serangan patogen. Peningkatan tersebut diduga disebabkan oleh aktifitas bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dalam jaringan tanaman. Senyawa fenol adalah hasil metabolisme tanaman yang dibentuk sebagai sistem ketahanan kimiawi tanaman untuk mencegah berkembangnya patogen tanaman (Nurchayani *et al.*, 2013). Menurut Agrios (2005), peningkatan metabolisme tanaman akibat infeksi patogen dan induksi ketahanan dari bakteri agens hayati yang menyebabkan peningkatan aktifitas PAL (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*) pada tanaman. Aktifitas PAL menyebabkan terjadinya akumulasi fenol karena fenol merupakan reaksi ketahanan tanaman yang bereaksi dengan PAL dan dioksidasi oleh Polyphenol Oksidase (PPO) dan Peroksidase (POD). Hasil penelitian Ngadze *et al.* (2012) menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara jumlah PAL, PPO, POD, dan total fenol terhadap besarnya tingkat degradasi pektin dan resistensi tanaman terhadap penyakit. Meningkatnya kadar fenol pada tanaman dapat menginduksi ketahanan sistemik tanaman sehingga mampu menekan serangan patogen.

Pengaruh *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap Masa Inkubasi dan Kejadian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tomat

Pada perlakuan semua isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* mempengaruhi masa inkubasi, kejadian penyakit, dan efektifitas penekanan penyakit (Tabel 2). Hasil pengamatan terhadap masa inkubasi menunjukkan bahwa pada tanaman yang diberi agens hayati memiliki masa inkubasi lebih lama dibandingkan kontrol. Masa inkubasi pada perlakuan streptomycin sulfat 20% sama dengan perlakuan *B. subtilis* UB-ABS2 dan *B. subtilis* UB-ABS6.

Perlakuan yang menunjukkan masa inkubasi terlama adalah *P. fluorescens* UB-PF5 dan *P. fluorescens* UB-PF6. Secara keseluruhan pemberian bakteri agens hayati mampu memperlambat masa inkubasi. Hasil penelitian Prihatiningsih *et al.* (2015) membuktikan bahwa aplikasi *B. subtilis* B315 melalui perendaman benih umbi kentang mampu menunda masa inkubasi selama 7 hari. Hal serupa juga dinyatakan oleh Hersanti *et al.* (2009) bahwa perlakuan *P. fluorescens* (Pf9) dan *B. subtilis* (Ba14) mampu memperlambat gejala layu bakteri pada kentang selama 3 hari lebih lama dibandingkan kontrol.

Tabel 2. Masa Inkubasi, kejadian penyakit dan efektifitas penekanan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat setelah aplikasi *B. subtilis* dan *P. fluoresce*

Perlakuan	Masa Inkubasi (hari)	Kejadian Penyakit (%)	Efektivitas Penekanan Penyakit (%)
Kontrol (akuades)	15,45 a	35,71 d	-
Bakterisida streptomycin sulfat 20%	21,16 b	21,42 bc	40
<i>B. subtilis</i> UB-ABS2	22,50 bc	17,85 ab	50
<i>B. subtilis</i> UB-ABS6	19,75 b	25,00 c	30
<i>P. fluorescens</i> UB-PF5	25,50 c	14,28 a	60
<i>P. fluorescens</i> UB-PF6	25,50 c	14,28 a	60

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5%.

Persentase penekanan kejadian penyakit layu bakteri di rumah kaca menunjukkan bahwa seluruh perlakuan agens hayati memperlihatkan kejadian penyakit yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan *B. subtilis* UB-ABS2 dan *B. subtilis* UB-ABS6 menghasilkan persentase kejadian penyakit yang sama dengan perlakuan bakterisida. Perlakuan *P. fluorescens* UB-PF5 dan *P. fluorescens* UB-PF6 menunjukkan persentase penekanan kejadian penyakit tertinggi yaitu sebesar 60% (Tabel 2).

Perlakuan agens hayati pada tanaman tomat mampu menekan persentase

kejadian penyakit layu bakteri dibandingkan hanya dengan penyiraman akuades. Hal ini diduga karena agens hayati yang diaplikasikan dapat mengkolonisasi perakaran dan melalui rangkaian mekanismenya mampu menghambat perkembangan *R. solanacearum* pada tanaman tomat. Bakteri agens hayati menghambat perkembangan patogen dengan beberapa mekanisme yaitu secara langsung dengan jalan menghasilkan berbagai senyawa metabolit anti patogen seperti siderophore, kitinase, antibiotik, dan sianida. Mekanisme secara tidak langsung

yaitu memicu ketahanan terimbas atau Induksi Ketahanan Sistemik (ISR) pada tanaman inang (Chen *et al.*, 2013). Hasil penelitian Istiqomah *et al.* (2017) menyatakan bahwa *B. subtilis* dan *P. fluorescens* mampu melarutkan fosfat dan memproduksi IAA (*Indole Acetic Acid*). Kedua zat ini dapat meningkatkan pertumbuhan dan kesehatan tanaman sehingga berimbas pada peningkatan ketahanan tanaman terhadap serangan patogen.

Ketahanan sistemik yang terbentuk dalam tanaman dapat diamati dengan menganalisa kandungan senyawa atau enzim penginduksi ketahanan seperti fenol dan peroksidase. Dalam penelitian ini, kandungan fenol pada tanaman tomat yang diberi perlakuan agens hayati lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol kecuali pada *B. subtilis* UB-ABS2. Hal ini membuktikan bahwa salah satu mekanisme yang meningkatkan ketahanan tanaman tomat terhadap penyakit layu bakteri adalah terbentuknya ketahanan sistemik tanaman melalui deteksi meningkatnya kadar fenol pada tanaman tomat.

SIMPULAN

Semua isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* memiliki potensi menghambat *R. solanacearum* pada uji antagonis dengan tipe antibiosis bakteriostatik. Perlakuan *B. subtilis* UB-ABS6, *P. fluorescens* UB-PF5, dan *P. fluorescens* UB-PF6 mampu meningkatkan kadar fenol tanaman tomat. Aplikasi semua isolat agens hayati mampu menghambat masa inkubasi dan menekan kejadian penyakit layu bakteri pada tanaman tomat dengan efektifitas penekanan 30-60%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, A. L. (2003). *Ilmu penyakit tumbuhan*. Malang: Bayumedia Publishing.
- Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by viruses. In *Plant Pathology. Fifth Edition*. Elsevier Academia Press (pp. 724–820).
- Champoiseau, P. G., Jones, J. B., & Allen, C. (2009). *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant Health Progress*, 10, 1–10. doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15(3), 848–864. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 780. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780
- Djarmiko, H. A., Arwiyanto, T., Hadisutrisno, B., & Sunarminto, B. H. (2007). Potensi tiga genus bakteri dari tiga rizosfer tanaman sebagai agensia pengendali hayati penyakit lincat. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*, 9(1). <https://doi.org/10.31186/jipi.9.1.40-47>
- Hersanti, H., Rupendi, R. T., Purnama, A., Hanudin, H., Marwoto, B., & Gunawan, O. S. (2009). Penapisan Beberapa Isolat *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* dan *Trichoderma harzianum* yang bersifat

- Antagonistik terhadap *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Kentang. *Agrikultura*, 20(3).
- Huang, J., Wei, Z., Tan, S., Mei, X., Yin, S., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt. *Applied Soil Ecology*, 72, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.017>
- Istiqomah, I., Aini, L. Q., & Abadi, A. L. (2017). Kemampuan *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* dalam melarutkan fosfat dan memproduksi hormon IAA (Indole Acetic Acid) untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman tomat. *Buana Sains*, 17(1), 75–84.
- Kawaguchi, A., Inoue, K., & Ichinose, Y. (2008). Biological control of crown gall of grapevine, rose, and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Phytopathology*, 98(11), 1218–1225. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1218>
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T. A., & Van der Waals, J. E. (2012). Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease*, 96(2), 186–192. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0149>
- Nurcahyani, E., Sumardi, I., Hadisutrisno, B., & Suharyanto, E. (2013). Penekanan perkembangan penyakit busuk batang vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) melalui seleksi asam fusarat secara in vitro. *Jurnal Hama Dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 12(1), 12–22. <http://dx.doi.org/10.23960/j.hptt.112.12-22>
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2013). Isolation and Characterization of *Bacillus* sp with In-vitro Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of Tomato. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1501–1512.
- Prihatiningsih, N., Arwiyanto, T., Hadisutrisno, B., & Widada, J. (2015). Mekanisme antibiosis *Bacillus subtilis* B315 untuk pengendalian penyakit layu bakteri kentang. *Jurnal Hama Dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 15(1), 64–71.
- Rivard, C. L., O'Connell, S., Peet, M. M., Welker, R. M., & Louws, F. J. (2012). Grafting tomato to manage bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in the southeastern United States. *Plant Disease*, 96(7), 973–978. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0877>
- Setiati, Y., N, H, Mutmainah., dan M, Subandi. (2016). Efektivitas jumlah telur *Corcyra cephalonica* terparasitasi *Trichogramma* sp. terhadap presentasi telur yang terparasit dan jumlah larva penggerek batang tebu bergaris (*Chilo sacchariphagus*). *Jurnal Agro*, III(1), 43–48. <https://doi.org/10.15575/811>
- Sharma, G. N., Dubey, S. K., Sati, N., & Sanadya, J. (2011). Phytochemical screening and estimation of total phenolic content in *Aegle marmelos* seeds. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(2), 27–29.
- Soesanto, L. (2008). Pengantar pengendalian hayati penyakit tanaman. In *PT Raja Grafindo Persada*. Jakarta (p. 574).
- Wahyudi, A. T., Meliah, S., & Nawangsih, A. A. (2011). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: isolasi, karakterisasi, dan

- telaah mutagenesis dengan transposon. *Makara Journal of Science*.
<https://doi.org/10.7454/mss.v15i1.885>
- Wati, F. D. A., Nurcahyanti, S. D., & Addy, H. S. (2017). Eksplorasi *Bacillus* spp., dari perakaran kubis sebagai agen antagonis *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 15(2).
- Weller, D. M., Mavrodi, D. V, van Pelt, J. A., Pieterse, C. M. J., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 102(4), 403–412. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-11-0222>