ISOLASI DAN KARAKTERISASI *Ralstonia solanacearum* PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI PADA BIBIT *Eucalyptus pellita* KLON 077 AA DAN PENGHAMBATANNYA OLEH Pseudomonad fluorescens

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Ralstonia solanacearum* CAUSE BACTERIAL WILT ON SEEDLINGS OF *Eucalyptus pellita* CLON 077 AA AND ITS INHIBITION BY Pseudomonad fluorescens

Ahmad Fajarusshidiq[1], Irfandri[2], Yunel Venita[2]
[1]Mahasiswa Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Riau
[2]Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Riau
Email korespondensi: ahmadfajarusshidiq99@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman *Eucalyptus pellita* serta mengetahui penghambatannya oleh Pseudomonad fluorescens. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau dan di Laboratorium *Plant Protection Department* PT. Arara Abadi Grup Sinarmas, Desa Pinang Sebatang Kecamatan Tualang Kabupaten Siak, Riau. Penelitian dilaksanakan dari bulan Juni hingga Agustus 2019. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksplorasi dan observasi dan data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Parameter penelitian yang diamati adalah karakteristik makroskopis, patogenesitas, karakteristik fisiologi, kemampuan daya hambat terhadap Pseudomonad fluorescens serta ras bakteri. Hasil isolasi bakteri patogen asal tanaman *Eucalyptus pellita* Klon 077 AA diperoleh isolat Rs-2 yang memiliki karakteristik makroskopis *Ralstonia solanacearum.* Hasil uji patogenesitas terhadap isolat Rs-2 menunjukkan reaksi positif sehingga isolat Rs-2 bersifat patogenik. Hasil uji fisiologi isolat Rs-2 menunjukkan reaksi negatif pada uji gram, reaksi positif pada uji oksidase dan reaksi positif pada uji OF. Luas zona hambatan yang dihasilkan oleh isolat Rs-2 sebesar 17,3 mm yang menunjukkan potensi hambatan yang tergolong kuat serta mekanisme hambatan secara bakteriostatis. Hasil uji ras patologi menunjukkan bahwa isolat Rs-2 merupakan *Ralstonia solanacearum* pada ras 1.

Keywords : *Eucalyptus pellita*, Isolasi, Karakterisasi, Pseudomonad fluorescens *Ralstonia solanacearum*

ABSTRACT

The research aims to isolate and characterize *Ralstonia solanacearum* cause bacterial wilt on seedlings of *Eucalyptus pellita* clon 077 AA and its inhibition by Pseudomonad fluorescens. The research was conducted at Laboratory of Plant Protection Department PT. Arara Abadi Group Sinarmas, Subregency of Tualang, Regency of Siak, Province of Riau from July to September 2019. The research was conducted using exploration and observation method and then analyzed descriptively. The observation parameters were morphological

[1]Mahasiswa Fakultas Pertanian Universitas Riau
[2]Dosen Fakultas Pertanian Universitas Riau

characteristic, physiological characteristic, virulency, inhibition ability by Pseudomonad fluorescens and bacterial race. Isolation of phatogenic bacteria from seedlings of *Eucalyptus pellita* clon 077 AA obtains two isolate which has similar morphological characteristic one each other. Physiological characteristic shows that *R. solanacearum* isolate Rs-2 has similar characters to *R. solanacearum* on colony colour in medium NAPSA+TZC, negative reaction on gram test, negative reaction on gram staining test, positive reaction on oxidase test and positive reaction on OF test. Virulency test of *R. solanacearum* isolate Rs-2 towards E. pellita seedlings shows positive reaction so *R. solanacearum* isolate Rs-2 is pathogenic. The inhibition zone that produced by Pseudomonad fluorescens towards *R. solanacearum* isolate Rs-2 is 17,3 mm in medium King's B and 12,4 mm in medium NAPSA and classifies as strong and the mechanism of its inhibition is bacteriostatic. The pathology race test shows that *R. solanacearum* isolate Rs-2 is *Ralstonia solanacearum* on race 1.

Keywords: Characterization, *Eucalyptus pellita*, isolation, Pseudomonad fluorescens, *Ralstonia solanacearum*

PENDAHULUAN

R. solanacearum merupakan salah satu penyebab penyakit pada tanaman yang tersebar luas di daerah tropika dan subtropika (Diniyah, 2010). *R. solanacearum* menyerang *Eucalyptus pellita* pada berbagai fase sejak di *nursery* dengan berbagai tahap mulai dari fase *stoolplants* hingga bibit siap tanam, *cutting* dan tanaman di Lapangan. *R. solanacearum* dilaporkan menyebabkan kehilangan hasil pada eukaliptus dengan tingkat serangan rata-rata 30 – 40% dengan rata-rata kematian pada eukaliptus umur 1,5 tahun mencapai 70% (Ran *et al*., 2005). *R. solanacearum* juga dikenal mampu beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (Peeters *et al*., 2013) serta mampu bertahan dalam jangka waktu yang lama di dalam tanah (Chakravarty dan Kalita, 2012).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit layu bakteri, namun belum menunjukkan hasil yang maksimal. Hal ini disebabkan oleh banyaknya inang alternatif dari *R. solanacearum* dan kemampuannya bertahan di dalam tanah. *R. solanacearum* menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang memblokir aliran air dan unsur hara dari akar ke seluruh tanaman, EPS juga berfungsi melindungi *R. solanacearum* dari deteksi oleh tanaman inang karena adanya benda asing yang masuk ke dalam jaringan tanaman (Arwiyanto, 2014). Untuk itu diperlukan metode pengendalian penyakit layu bakteri yang lebih kompatibel, terjangkau dan efektif menekan serangan *R. solanacearum*, serta lebih aman terhadap lingkungan. Salah satu alternatif pencegahan dan pengendalian yang dapat dilakukan adalah dengan memanfaatkan mikroba agens pengendali hayati yakni Pseudomonad fluorescens.

Pseudomonad fluorescens merupakan bakteri pengkoloni akar tanaman (*rhizobacteria*) yang efektif, hal ini disebabkan karena kemampuannya menghasilkan berbagai senyawa penghambat pertumbuhan seperti hidrogen sianida (HCN), *monoacetyl phloroglucinol*, 2-4 *detaetylphoro glucinol*, *pioluterin*, siderofor dan asam salisilat (Manidipa *et al*., 2013). Pseudomonad fluorescens terbukti efektif dalam menekan *R. solanacearum* pada pembibitan *Eucalyptus urophylla* di China (Ran *et al*., 2005) dan mampu menghasilkan zona hambatan yang kuat pada *R. solanacearum* asal tanaman jahe pada uji *in vitro* (Qisti, 2018).

Penelitian mengenai penyakit layu bakteri telah banyak dilakukan, namun penelitian tersebut banyak dilakukan pada spesies *E. dunii, E. camaldulensis, E. saligna, E. grandis* dan *E. urophylla*. Faktanya mayoritas eukaliptus yang dibudidayakan di Indonesia merupakan *E. pellita*. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih dalam mengenai penyakit layu bakteri pada *E. pellita*. Penulis telah melakukan penelitian dengan judul "Isolasi dan Karakterisasi *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Bibit *Eucalyptus pellita* Klon 077 AA dan Penghambatannya oleh Pseudomonad fluorescens".

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri pada bibit *Eucalyptus pellita* klon 077 AA serta mengetahui besaran penghambatannya oleh Pseudomonad fluorescens.

BAHAN DAN METODE

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium *Plant Protection Department* PT. Arara Abadi Grup Sinarmas, Desa Pinang Sebatang Kecamatan Tualang Kabupaten Siak, Riau. Penelitian dilaksanakan dari bulan Juli hingga September 2019.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah medium *King's* B, *nutrient agar potato sucrose agar* (NAPSA), KOH 3%, *Kovac's oxydase* 1%, medium agar air 0,6%, aquades streril, alkohol 70%, kertas saring *whatman*, medium O-F, kloroform, minyak parafin, spiritus, label, kertas, tisu gulung, gelatin, bibit *E. pellita* klon 077 AA dengan umur ± 3 bulan yang menunjukkan gejala terserang penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*, bibit *E. pellita* sehat umur ± 3 bulan, bibit tomat umur ± 20 hari, bibit pisang umur ± 1 bulan, bibit jahe umur ± 2 bulan dan isolat Pseudomonad fluorescens asal tanaman jahe koleksi Qisti (2018).

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau yang disterilkan, *plastic wrap*, plastik steril, amplop, kapas, *alumunium foil*, *syringe*, pinset, jarum ose, pipet tetes, kulkas, kompor gas, oven, *erlenmeyer* 250 ml dan 500 ml, cawan petri berdiameter 9 cm, timbangan analitik, batang pengaduk, tusuk gigi, korek api, *orbital shaker, automatic shaker,* autoklaf, *laminar air flow cabinet inkubator*, kamera dan alat tulis.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksploratif dan observatif. Pelaksanaan penelitian terdiri atas; 1) Peremajaan Bakteri Pseudomonad fluorescens; 2) Pengambilan sampel bibit *E. pellita* klon 077 AA yang menunjukkan gejala terserang penyakit layu bakteri; 3) Isolasi dan pemurnian isolat bakteri asal bibit *E. pellita* Klon 077 AA; 4) Karakterisasi isolat bakteri patogen asal bibit *E. pellita* Klon 077 AA; 5) Karakterisasi sifat morfologi; 6) Karakteristik sifat fisiologi (Uji warna koloni bakteri, Uji gram, Uji oksidase, Uji kebutuhan oksigen (Oksidasi- Fermentasi = OF); 7) Uji penghambatan dan mekanisme hambatan bakteri *R. solanacearum* oleh Pseudomonad fluorescens; 8) Uji virulensi; dan 9) Uji ras patologi.

Parameter Pengamatan yang diamati yaitu; 1) Karakterisasi isolat bakteri patogen asal bibit sakit *E. pellita* klon 077 AA; 2) Karakterisasi sifat morfologi; 3) Karakteristik sifat fisiologi (Warna koloni bakteri, Gram, Oksidase, Kebutuhan oksigen (Oksidasi- Fermentasi = OF); 4) Daya hambat dan mekanisme hambatan *R. solanacearum* oleh Pseudomonad fluorescens; 5) Virulensi; dan 6) Ras patologi.

Data virulensi, ras, daya hambat, mekanisme hambatan, karakteristik morfologi dan fisiologi, dianalisis secara

deskriptif kemudian ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri Patogen Asal Bibit Sakit *Eucalyptus pellita* Klon 077 AA

Isolasi bakteri patogen asal bibit sakit *E. pellita* Klon 077 AA yang terserang penyakit layu bakteri diperoleh dua isolat yang mempunyai karakteristik morfologi sama. Karakteristik morfologi koloni bakteri disajikan pada Tabel 1.

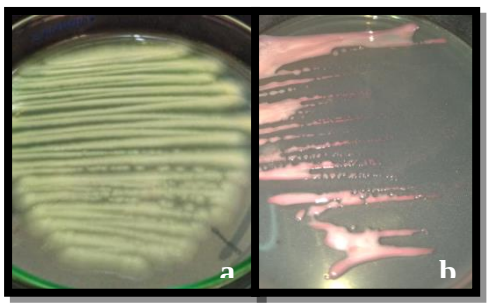
Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni bakteri patogen asal bibit sakit *Eucalyptus pellita* Klon 077 AA pada medium NAPSA

Isolat	Bentuk	Tepian	Elevasi
Rs-1	Bulat	Halus	Timbul
Rs-2	Bulat	Halus	Timbul

Tabel 1. menunjukkan bahwa koloni bakteri Rs-1 dan Rs-2 memiliki karakteristik yang sama pada semua parameter pengamatan morfologi bakteri. Isolat Rs-1 dan Rs-2 memiliki bentuk koloni bulat, tepian koloni halus dan elevasi koloni timbul, sehingga perlu dilakukan uji sifat fisiologi untuk memastikan bahwa isolat Rs-1 dan Rs-2 adalah *R. solanacearum*.

Karakteristik Fisiologi Isolat Bakteri Patogen Asal Bibit Sakit *Eucalyptus pellita* Klon 077 AA

Pengujian sifat fisiologi isolat bakteri patogen Rs-1 dan Rs-2 asal bibit *E. pellita* klon 077 AA dilakukan dengan menumbuhkan pada medium NAPSA yang telah ditambahkan TZC. Hal ini dilakukan untuk melihat sifat fisiologi warna koloni bakteri. Hasil pengujian warna koloni bakteri disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni bakteri patogen asal bibit *Eucalyptus pellita* Klon 077 AA pada medium NAPSA+TZC, a) isolat Rs-1, b) isolat Rs-2

Gambar 1. menunjukksn bahwa isolat Rs-1 memiliki warna koloni bakteri putih pucat sedangkan isolat Rs-2 memiliki warna koloni putih, fluidal dengan pusat koloni berwarna merah muda pada medium NAPSA yang telah ditambahkan TZC. Hal ini menunjukkan bahwa isolat Rs-1 bukan *R. solanacearum* sedangkan isolat Rs-2 diduga sebagai *R. solanacearum* dan sejalan dengan hasil penelitian Hayward (1984) bahwa tipe koloni *R. solanacearum* virulen adalah berwarna putih, fluidal dengan pusat koloni berwarna merah muda pada medium yang ditambahkan TZC. Untuk memastikan bahwa isolat Rs-2 adalah

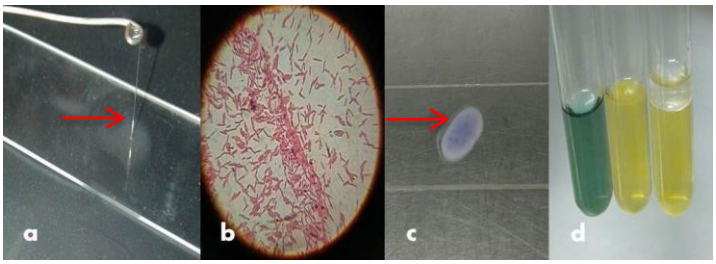
adalah *R. solanacearum*, maka dilakukan pengujian sifat-sifat fisiologi lainnya yang dibandingkan dengan sifat fisiologi *R. solanacearum* yang telah dideskripsikan oleh Schaad *et al*. (2001). Karakteristik fisiologi *R. solanacearum* isolat Rs-2 disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil karakterisasi fisiologi *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2

Sifat fisiologi	*Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2	*Ralstonia solanacearum* menurut Schaad *et al*. (2001)
Gram (KOH 3%)	Negatif	Negatif
Pewarnaan gram	merah keunguan	merah keunguan
Oksidase	+	+
OF	+	+

Keterangan : + = reaksi positif, - = reaksi negatif

Tabel 2. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 memiliki sifat fisiologi yang sama dengan yang telah dideskripsikan oleh Schaad *et al*. (2001). *R. solanacearum* isolat Rs-2 merupakan gram negatif pada uji gram menggunakan KOH 3%, berwarna merah pada uji pewarnaan gram, reaksi positif pada uji oksidase dan bersifat fermentatif pada uji OF. Hasil pengamatan sifat fisiologi *R. solanacearum* isolat Rs-2 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji sifat fisiologi *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2, a) gram bakteri (KOH 3%), b) pewarnaan gram bakteri, c) oksidase bakteri, d) uji OF bakteri

R. solanacearum isolat Rs-2 merupakan bakteri gram negatif yang dibuktikan dengan adanya bentuk seperti lendir ketika diangkat dengan ose saat koloni bakteri telah ditetesi dengan larutan KOH 3% (Gambar 2a.). Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif memiliki dinding sel tipis yang berada di ruang periplasma. KOH 3% yang digunakan dalam penelitian akan menyerang lemak (*bilayer lipid)* dan membuat dinding sel bakteri gram negatif pecah. Pecahnya dinding sel akan melepaskan materi genetik (DNA) yang merupakan subtansi melimpah di dalam sel bakteri. Molekul DNA yang sangat panjang bersifat *sticky strings* (menyerupai lendir, getah dan lengket) yang menyebabkan hasil seperti lendir saat diangkat dengan ose sedangkan pada bakteri gram positif tidak karena memiliki dinding sel yang tebal. Hal ini sejalan dengan pernyataan Chandra dan Mani (2011) yang menyatakan bahwa bakteri gram negatif memiliki lemak yang tebal dengan dinding sel tipis sedangkan bakteri gram positif memiliki berdinding sel tebal dengan lemak yang tipis. Larutan KOH 3% akan merusak lemak (*bilayer lipid*) dan membuat sel bakteri gram negatif pecah dan mengeluarkan cairan kental sedangkan bakteri gram positif tidak berpengaruh.Untuk mendapatkan hasil

yang lebih akurat maka *R. solanacearum* isolat Rs-2 dilakukan uji pewarnaan gram.

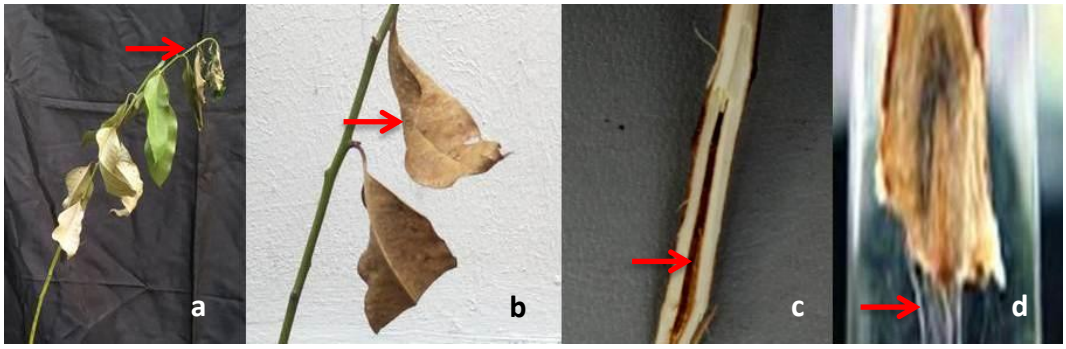
Gambar 2b. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 merupakan bakteri gram negatif dibuktikan dengan warna merah muda pada koloni bakteri setelah diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 10x. Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang tipis sehingga saat proses pencucian menggunakan alkohol menyebabkan terbukanya dinding sel bakteri gram negatif sehingga zat warna kristal violet yang telah diserap sebelumnya menjadi terlepas. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Fardi (2012) yang melaporkan bahwa bakteri gram negatif berwarna merah muda karena lipid yang terdapat di dalam dinding sel akan terlarut saat proses pencucian menggunakan alkohol sehingga pori-pori dan dinding sel akan membesar dan menyebabkan terlepasnya zat warna kristal violet dan bakteri akan berwarna merah muda setelah diberi zat warna safranin.

Gambar 2c. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 mengalami perubahan warna menjadi ungu tua setelah diberi *kovac's oxydase* 1% setelah dibiarkan selama 10 detik. Hal ini membuktikan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 menghasilkan enzim oksidase sitokrom. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Saputra (2015) dimana isolat *R. solanacearum* yang digunakan dalam penelitian berubah warnanya menjadi ungu tua yang menandakan bakteri gram negatif.

Gambar 2d. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 bersifat fermentatif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna media dari hijau menjadi kuning. Perubahan warna ini disebabkan oleh konsentrasi asam tinggi yang dihasilkan selama proses fermentasi berlangsung sehingga akan menurunkan pH medium serta adanya indikator bromtimol biru yang mengubah warna media menjadi kuning. Hal ini sejalan dengan penelitian Koneman (2006) yang melaporkan bahwa pada uji OF, bakteri gram negatif dapat melakukan metabolisme karbohidrat berdasarkan oksidasi fermentasi disebabkan adanya konsentrasi asam yang dihasilkan selama fermentasi yang menurunkan pH medium sehingga indikator berubah dari hijau menjadi kuning. *R. solanacearum* isolat Rs-2 telah diketahui memiliki sifat yang sama dengan *R. solanacearum* melalui uji sifat fisiologi, sehingga perlu dilakukan uji virulensi untuk mengetahui daya infeksinya terhadap bibit *Eucalyptus pellita*.

Virulensi *Ralstonia solanacearum* Isolat Rs-2

Hasil pengujian virulensi menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 yang diduga *R. solanacearum* dapat menginfeksi bibit *E. pellita* sesuai dengan gejala yang dideskripsikan oleh Alfenas *et al*. (2006). Hal ini menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 bersifat virulen terhadap bibit *E. pellita*. Hasil uji virulensi *R. solanacearum* isolat Rs-2 dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji virulensi *Ralstonia solanacearum* isolat Rs- 2 pada bibit *Eucalyptus pellita*, a) daun muda layu pada 17 hsi, b) gejala lanjut berupa daun tua berwarna kuning kecoklatan pada 21 hsi, c) berkas pembuluh berwarna coklat pada 21 hsi, d) massa bakteri *Ralstonia solanacearum* pada 21 hsi

Gambar 3. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 memiliki daya virulensi yang tinggi dibuktikan dengan terjadinya perubahan warna pada daun sejak 9 hari setelah inokulasi (hsi). Gejala dimulai dengan bibit *E. pellita* mengalami perubahan warna menjadi lebih terang pada daun bibit hingga menjadi nekrosis dan menyebabkan bibit *E. pellita* mengalami layu pada daun muda pada 17 hsi (Gambar 3a.) dengan gejala lanjut berupa daun tua berwarna kuning kecoklatan pada 21 hsi (Gambar 3b.). Batang bibit yang terserang kemudian dipotong dan ditemukan berkas pembuluh yang berwarna kecoklatan pada 21 hsi (Gambar 3c.). Selanjutnya akar bibit dimasukkan ke dalam tabung reaksi bening yang berisi air jernih, setelah dibiarkan selama lima menit, ditemukan adanya massa bakteri yang keluar dari jaringan tanaman pada 21 hsi (Gambar 3d.).

Alfenas *et al*. (2006) yang melaporkan bahwa gejala awal terserang *R. solanacearum* dimulai dengan layunya daun muda dengan gejala lanjut berupa daun tua berwarna kuning kecoklatan. Gejala khas dapat diamati pada potongan batang yang terserang *R. solanacearum* dimana berkas pembuluh tampak berwarna coklat. Rukmana (1997) melaporkan bila potongan pangkal batang dipotong dan dimasukkan ke dalam gelas bening berisi air jernih, maka beberapa menit kemudian akan keluar massa bakteri *R. solanacearum* seperti lendir berwarna susu kecoklatan.

Gejala bibit *E. pellita* yang terinfeksi *R. solanacearum* terlihat sejak 9 hsi. Hal ini diduga atas kemampuan *R. solanacearum* isolat Rs-2 dalam menginfeksi bibit *E. pellita* yang bersifat kompatibel. Nuraeny (2001) melaporkan bahwa masa inkubasi bakteri patogen tergantung dari kemampuan bakteri dalam menginfeksi tanaman inang dengan kisaran masa inkubasi antara 1-39 hari. Lebih lanjut Semangun (2006) menjelaskan bahwa infeksi secara langsung dapat terjadi jika populasi bakteri dalam tanah semakin tinggi. Masa inkubasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya tanaman inang, lingkungan dan patogen dalam menentukan lama waktu yang dibutuhkan oleh bakteri dalam menimbulkan gejala awal infeksi.

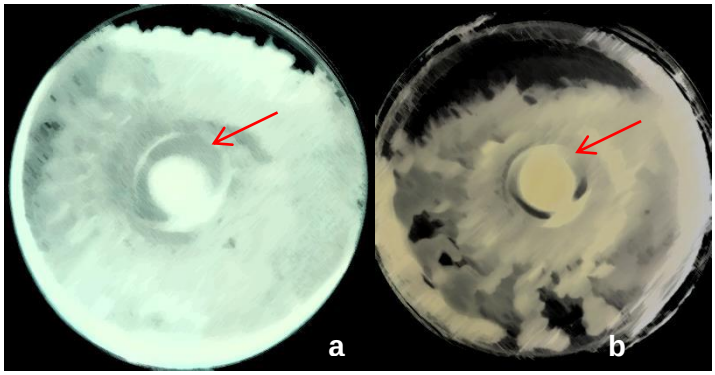
Hasil uji virulensi yang diperoleh menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 virulen terhadap bibit *E. pellita* sehingga dilakukan uji daya hambat dan mekanisme hambatannya oleh Pseudomonad fluorescens.

Daya Hambat dan Mekanisme Hambatan *Ralstonia solanacearum* Isolat Rs-2 oleh Bakteri Pseudomonad fluorescens

Hasil pengamatan daya hambat *R. solanacearum* isolat Rs-2 oleh bakteri Pseudomonad fluorescens menghasilkan zona hambatan yang tinggi. Hasil daya hambat *R. solanacearum* isolat Rs-2 oleh bakteri Pseudomonad fluorescens disajikan pada Tabel 3. dan Gambar 4.

Tabel 3. Daya hambat *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2 oleh bakteri Pseudomonad fluorescens

Medium	Zona hambatan (mm)	Mekanisme hambatan	Potensi hambatan
King's B	17,3	Bakteriostatis	Kuat
NAPSA	12,4	Bakteriostatis	Kuat



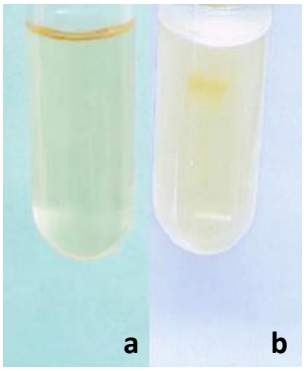
Gambar 4. Daya hambat *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2 oleh bakteri Pseudomonad fluorescens, a) pada medium *King's* B, b) pada medium NAPSA

Tabel 3. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 memiliki zona hambatan yang dibuktikan dengan zona bening yang terbentuk (Gambar 4.). Hal ini menunjukkan bahwa potensi hambatan yang dihasilkan *R. solanacearum* isolat Rs-2 pada medium *King's* B termasuk kategori "kuat" ditandai dengan terbentuknya zona bening sepanjang 17,3 mm (Gambar 4a.) dan pada medium NAPSA juga termasuk kategori "kuat" yang dibuktikan dengan terbentuknya zona bening sepanjang 12,4 mm (Gambar 4b.). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Qisti (2019) yang menggunakan bakteri Pseudomonad fluorescens yang sama namun diujikan pada *R. solanacearum* yang berasal dari tanaman jahe dimana menunjukkan zona hambatan sebesar 12 mm yang tergolong "kuat".

Hasim (2003) menyatakan bahwa kekuatan antibiotik suatu bakteri dapat ditentukan dengan terbentuknya daerah hambatan, jika lebih dari 20 mm maka potensi hambatan tergolong "sangat kuat", daerah hambatan dengan kisaran 10-20 mm, maka potensi hambatan tergolong "kuat" sedangkan daerah hambatan dibawah 10 mm, maka potensi hambatan tergolong "rendah".

Zona hambatan yang terbentuk di sekitar koloni bakteri Pseudomonad fluorescens dikarenakan terbentuknya senyawa antibiotik yang dikeluarkan ke dalam medium dan menghasilkan mekanisme secara antibiosis. Antibiosis merupakan mekanisme secara langsung dengan menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik atau senyawa yang mudah menguap, siderofor dan subtansi toksik lainnya (Haggag dan Mohamed, 2007). Strobel dan Daisy (2003)

menyatakan bahwa terbentuknya zona hambatan mengindikasikan bahwa bakteri menghasilkan antibiotik. Selanjutnya *R. solanacearum* isolat Rs-2 dilakukan uji mekanisme hambatan. Hasil uji mekanisme hambatan *R. solanacearum* isolat Rs-2 disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme hambatan *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2 pada medium larutan pepton, a) kontrol, b) *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2

Gambar 5. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 mengalami perubahan warna menjadi keruh setelah diinkubasi selama 24 jam (Gambar 5b.). Gambar 5. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 menghasilkan reaksi antibiosis secara bakteriostatis. Hal ini membuktikan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 yang telah terhambat masih mampu tumbuh pada media larutan *peptone* yang merupakan ciri dari antibiosis secara bakteriostatis. Hal ini sejalan dengan penelitian Djatmiko *et al*. (2007) yang menyatakan bahwa zona hambatan yang terbentuk pada uji antagonisme terhadap *R. solanacearum* memiliki mekanisme hambatan secara bakteriostatis yang dibuktikan dengan larutan *peptone* berwarna keruh. Lebih lanjut Saputra (2015) melaporkan bahwa isolat Pseudomonad fluorescens yang diujikan dengan isolat *R. solanacearum* dalam penelitiannya juga menghasilkan reaksi antibiosis secara bakteriostatis ketika diujikan.

Pankey dan Sabath (2004) menyatakan bahwa tipe antibiosis bakteriostatis membuktikan bahwa bakteri antagonis dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan sehingga menyebabkan bakteri patogen tetap berada dalam fase pertumbuhan stasioner. Tipe antibiosis bakterisidal menunjukkan bahwa bakteri antagonis menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mampu membunuh bakteri patogen sehingga patogen tidak dapat tumbuh dan berkembang lagi.

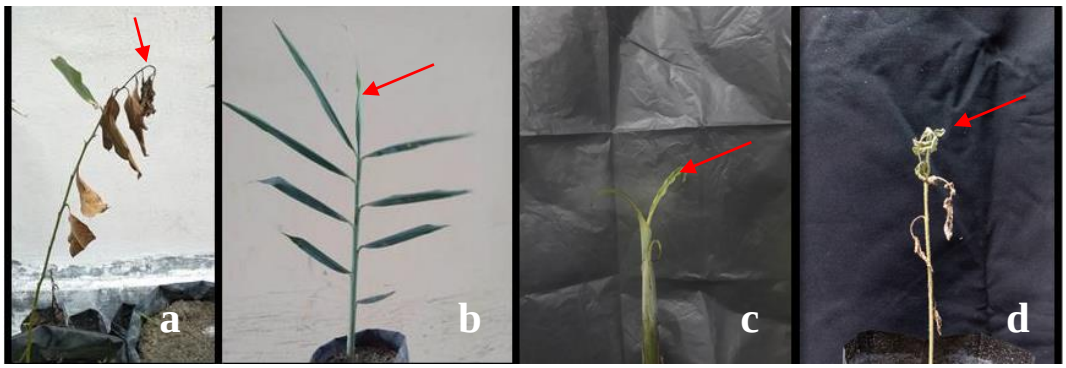
Ras Patologi *Ralstonia solanacearum* Isolat Rs-2

Hasil pengamatan uji ras patologi *R. solanacearum* isolat Rs-2 terhadap bibit *E. pellita*, jahe, pisang dan tomat menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Hasil pengamatan didasarkan atas gejala terinfeksi *R. solanacearum* yang merujuk pada hasil penelitian Alfenas *et al*. (2006). Hasil pengamatan uji ras patologi *R. solanacearum* isolat Rs-2 dapat dilihat pada Tabel 4. dan Gambar 6.

Tabel 4. Hasil uji ras patologi *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2

Tanaman inang	Reaksi tanaman	Lama waktu muncul gejala awal (hsi)
Eucalyptus pellita	+	9
Jahe	-	-
Pisang	-	-
Tomat	+	5

Keterangan : + = menunjukkan gejala layu bakteri, - = tidak menunjukkan gejala layu bakteri



Gambar 6. Hasil pengamatan uji ras patologi *Ralstonia solanacearum* isolat Rs-2, a) gejala terserang *R. solanacearum* pada bibit *Eucalyptus pellita* pada 17 hsi, b) reaksi negatif pada bibit jahe, c) reaksi negatif pada bibit pisang, d) gejala terserang *R. solanacearum* pada bibit tomat pada 9 hsi

R. solanacearum isolat Rs-2 terbukti mampu menyebabkan gejala kelayuan yang merupakan ciri utama *R. solanacearum*. Hal ini sejalan dengan laporan Alfenas *et al*. (2006) yang melaporkan bahwa gejala awal terserang *R. solanacearum* dimulai dengan layunya daun muda dengan gejala lanjut berupa menguningnya daun tua. Gambar 6. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 menyebabkan gejala terserang *R. solanacearum* pada bibit percobaan dengan waktu awal muncul gejala yang berbeda-beda. Gejala terserang *R. solanacearum* muncul pada bibit *Eucalyptus pellita* sejak 9 hsi dan bibit tomat sejak 5 hsi. Gejala terserang *R. solanacearum* tidak muncul pada bibit jahe (Gambar 6b.) dan bibit pisang (Gambar 6c.).

Tabel 4. dan Gambar 6. menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 merupakan *R. solanacearum* pada ras 1. Hal ini sejalan dengan deskripsi ras patologi *R. solanacearum* yang telah dideskripsikan oleh Denny dan Hayward (2001) dimana *R. solanacearum* dikelompokkan ke dalam ras 1 jika menunjukkan gejala pada tanaman eukaliptus, tomat, kentang, kacang-kacangan, terung, labu-labuan, tembakau, jati, nilam, berbagai jenis *legume* di wilayah Asia, Australia dan Amerika. *R. solanacearum* dikelompokkan ke dalam ras 2 jika menunjukkan gejala pada tanaman jenis pisang di wilayah Caribbean, Brazil dan Filipina. *R. solanacearum* dikelompokkan ke dalam ras 3 jika menyerang tanaman jenis kentang, berbagai jenis solanaceae (terung)

dan geranium pada dataran tinggi di seluruh dunia kecuali Amerika Serikat dan Canada. *R. solanacearum* dikelompokkan ke dalam ras 4 jika menunjukkan gejala pada tanaman jahe di wilayah Asia dan ras 5 hanya terjadi pada tanaman *mulberry* di China.

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolasi bakteri patogen asal bibit sakit *E. pellita* Klon 077 AA dua isolat yang memiliki karakteristik morfologi sama antara satu sama lainnya. Hasil pengujian fisiologi isolat bakteri patogen pada medium NAPSA+TZC menunjukkan bahwa *R. solanacearum* isolat Rs-2 memiliki warna koloni bakteri putih, fluidal dengan pusat koloni berwarna merah muda dan menunjukkan gram negatif pada uji gram menggunakan KOH 3%, berwarna merah pada pewarnaan gram, menghasilkan enzim oksidase sitokrom pada uji oksidase dan bersifat fementatif pada uji OF. Zona hambatan yang dihasilkan oleh Pseudomonad fluorescens terhadap *R. solanacearum* isolat Rs-2 sebesar 17,3 mm pada medium *King's* B dan 12,4 mm pada medium NAPSA yang menunjukkan potensi hambatan yang tergolong kuat serta mekanisme hambatan secara bakteriostatis dan termasuk ke dalam ras 1.

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk melihat daya hambat *R. solanacearum* oleh Pseudomonad fluorescens pada tanaman *E. pellita* di lapangan serta identifikasi lanjutan terhadap Pseudomonad fluorescens untuk mengetahui spesies bakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Alfenas, A. C., R. G. Mafia, R. C. Sartorio, D. H. B. Binoti, R. R. Silva, dan D. Lau. 2006. *Ralstonia solanacearum* em vivetros clonais de eucalipto no brasil. *Fitopatol*. 31(1): 357–366.

Arwiyanto, T., M. Goto dan Y. Takikawa. 1993. Characterization of bacteriocins Produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Annals Phytopathological Society of Japan*. 59(2): 114-122.

Arwiyanto, T. 1997. Pengendalian hayati penyakit layu bakteri tembakau. *Jurnal perlindungan Tanaman Indonesia*. 3(2): 44-60.

Badan Pusat Statistik (BPS). 2016. Statistik Perusahaan Pembudidaya Tanaman Kehutanan 2015. Diakses pada 3 februari 2019.

Badan Pusat Statistik (BPS). 2018. Statistik Perusahaan Pembudidaya Tanaman Kehutanan 2017. Diakses pada 3 februari 2019.

Chakravarty, Gargi dan M. C. Kalita. 2012. Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial wilt of Brinjal and its possible plant growth promoting effects. *Annals of Biological Research*. 3(11): 5083-5094.

Chandra, T. J., dan S. Mani. 2011. A study of 2 rapid tests to differentiate Gram positive and Gram negative aerobic bacteria. *Journal medicine applied science*. 84-85

Countinho, T. A. J. Roux, K. H. Riedel, J. Terblanche dan M. J. Wingfield. 2000. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in south africa. *Forest Pathol*. 30(2): 205-210.

Denny, T. P dan A. C. Hayward. 2001. *Ralstonia solanacearum*:Laboratory Guide For Identification Of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press.

Diniyah, S. 2010. Potensi Bakteri Endofit Sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) Dan Jamur (*Fusarium* sp. dan *Phytophthora infestans*) Penyebab Penyakit Layu Pada Tanaman. http://etheses.uin-malang.ac.id/963/. Diakses 6 Juli 2018.

Djatmiko, H., A. T. Arwiyanto, B. Hadisutrisno dan B. H. Sunarminto. 2007. Potensi tiga genus bakteri dari tiga rizosfer tanaman sebagai agensia pengendali hayati penyakit lincat. *Jurnal ilmu-ilmu pertanian Indonesia*. 9:40-47

Eldridge K. G., J. Davidson, C. Harwood dan Wyk. 1993. Eucalypt Domestication And Breeding. Oxford (UK): Clarendon Press.

Erwin. 2000. Hama Dan Penyakit Tanaman Tembakau Deli. Balai Penelitian Tembakau Deli PTP. Nusantara II (Persero), Medan.

Fardi, S. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif Pada Preputium Kerbau (*Bubalus bubalis*) Asal Aceh Barat Daya. Skripsi (tidak untuk dipublikasikan). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.

Hadioetomo. 1993. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Gramedia. Jakarta.

Haggag, W. M dan H. A. Mohamed. 2007. Biotechnological aspects of microorganism used in plant biological control. *World Journal of Agriculture*. 3(6):771-776.

Hasim. 2003. Memanen Antibiotik. Kompas No. 127. Tahun ke-39. Jakarta.

Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas fluorescens. *Annual review of Phytopathology*. 29:65-87

Hayward A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum* in Enclopedia of Microbiology. 16(4): 32–42.

Hung, T. D., T. Jeremy, Brawner, R. Meder, J. David, Lee, S. Southerton, H. H. Thinh dan M. J. Dieters. 2014. Estimates of genetic parameters for growth and wood properties in *Eucalyptus pellita* F. Muell. to support tree breeding in Vietnam. *Ann forest sci*. 72(2): 205-217.

Kloepper, J. W. 1993. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agens. In Soil Microbial Ecology-Aplication in Agricultural and Environmental Management, F.B. Metting (eds), Jr. Marcel Dekker, New York.

Koneman, E. W. 2006. Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology. Edisi ke-6. Lippincott williams and wilkins. Philadephia.

Kumar, A. N., K. Min Jeong., K. Sun Chul dan M. D. Kumar. 2007. Role of chitinase and β-1,3- glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology*. 53(2): 207-212.

Lelliot, R. A. dan D. E. Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Methods in Plant Pathology, British Society for Plant Pathology. *Blackweel Scientific Publications*. (2): 212.

Lin, X. J., G. J. Wu, M. W. Shi, J. X. Cai, J. H. Huang, M. X. Zhang, S. C. Xu,

R. L. Li dan J. W. Huang. 1993. Characteristics of the pathogen of bacterial wilt in Eucalyptus. *Hunan Forestry Sci. Tech*. 20: 6-10.

Manidipa, R., S. G. Dutta dan R. C. Venkata. 2013. Pseudomonads Potential Biocontrol Agents of Rice Diseases. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 1(9): 19-25.

Nuraeny, T. 2001. Patogenisitas bakteri layu pisang *Ralstonia* sp. pada beberapa tanaman. *Jurnal hama dan penyakit tumbuhan tropika*. 1:60-62

Orwa, C, A. Mutua, R. Kindt, R. Jamnadass dan S. Anthony. 2009. Agroforestree Database: A Tree Reference And Selection Guide Version 4.0. http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabase.asp. Diakses tanggal 2 september 2019.

Pankey, G. A. dan L.D. Sabath. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*. 38:864-870

Peeters, N., A. Guidot, F. Vailleau dan M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*; a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic area. Mol. *Plant Pathol*. 14: 651-662.

Qisti, W. A. 2019. Isolasi dan uji daya antagonis Pseudomonad fluorescens asal rhizosfer tanaman jahe merah terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri. Skripsi (Tidak dipublikasikan). Universitas Riau. Pekanbaru.

Ran, L. X., C. Y. Liu., G. J. Wub., L. C. van Loon dan P. A. H. M. Bakker. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by *Pseudomonas fluorescent* in China. *Biological Control*. (32): 111–120.

Rukmana, 1997. The potential of rhizobacteria in controlling blood disease of banana. J. Int. Soc. *Southeast Asian Agric. Sci*. Academic Frontier Center. Tokyo University of Agriculture. Tokyo. Japan.

Saputra, Rachmad. 2015. Uji aktivitas antagonistik beberapa isolat *Bacillus* spp. terhadap penyakit layu bakteri *Ralstonia solanacearum* pada beberapa varietas tomat dan identifikasinya. Prosiding seminar nasional masyarakat biodiversiti Indonesia. 1(5): 1116-1122.

Saravanan, T., Bhaskaran dan R. Muthusamy, M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced enzymoiogical changes in banana roots (cv. rasthali) against fusarium wilt disease. *Plant Pathology Journal*. 3 (2): 72-80.

San-Lang, W. C. Shin-Jen dan W. Chuan-Lu. 2008. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydrate Research*. 343(7): 1171-1179.

Schaad, N. W., J. B. Jones dan W. Chun. 2001. Laboratory Guide For Identification Of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edition. Minnesota. APS press.

Semangun, H. 2000. Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Strobel, G. dan B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbial and molecular biology reviews. *Journal of microbiol*. 67:491-502.

Supriadi. 2006. Analisis resiko agens hayati untuk pengendalian patogen pada tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian*. 25(3): 23-29.

Wang, G. P., K. Luo, X. L. Liao, Z. C. Zhou dan Z. H. Peng. 2014. Studies on the *Pseudomonas solanacearum* pathogenicity and biotype of the tobacco in Hunan province. *Journal of Hunan Agriculture*. 22: 371-374.