

DAYA TAHAN HIDUP *PSEUDOMONAD* FLUORESEN DI DALAM MATRIKS ORGANIK PILEN
TEMBAKAU
*SURVIVAL OF FLUORESCENT PSEUDOMONAD IN ORGANIC MATRIX OF COATED
TOBACCO-SEED*

Oleh:

Triwidodo Arwiyanto

Fakultas Pertanian UGM Bulaksumur, Yogyakarta 55281

Telp./Fax. 0274 523926 Email: tarwiyanto@yahoo.com

(Diterima: 2 April 2007; Disetujui: 28 April 2007)

ABSTRACT

Strain Pf-20 of *Pseudomonas putida* and pseudomonad fluorescent isolate Pf-33 are the biological control agents of tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. The method of delivery of the biological control, however, is inefficient and laborious due to the need a lot of bacterial suspension for dipping the seedlings before transplanting. The use of cattle manure as a main substance for coating of tobacco seed was reported here. The cattle manure was sieved to 0.09 mm then mixed with 0.1% CMC and suspension of Pf-20 and Pf-33. Prior coating, the seeds were surface sterilized with 1% sodium hypochloride for 30 seconds then air dried. The sterilized seeds were coated with the matrix until the size is 1.5–2.00 mm. The results indicated that fluorescent pseudomonad could survive longer in the coated seed when strain Pf-20 of *P. putida* and fluorescent pseudomonad isolate Pf-33 were used together in one formulation. Fluorescent pseudomonad could survive in the coated seed for 4 weeks. Seed germination, however, was not affected by coating with the materials stated above.

PENDAHULUAN

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* menyebabkan kerugian yang tidak sedikit pada pertanaman tembakau (Semangun, 2000). Pada tahun 1994, dilaporkan penyakit ini menyebabkan kematian tanaman tembakau cerutu sampai 50% (Arwiyanto, 1995). Di Temanggung, pa-togen yang sama menyebabkan penyakit lincat bersama-sama dengan nematoda *Meloidogyne incognita* (Dalmadiyo, 2004). Penyakit lincat menyebabkan kerugian pada tembakau temanggung yang dikenal sebagai tembakau saus untuk rokok keretek.

Pengendalian terhadap penyakit layu bakteri harus dilakukan secara terpadu, meskipun sampai sekarang belum diperoleh metode yang efektif

untuk menekan penyakit tersebut. Pengendalian hayati dengan menggunakan bakteri rizosfer merupakan salah satu cara pengendalian yang dapat dipadukan dengan cara pengendalian yang lain, seperti pengolahan tanah yang benar, pergiliran tanaman, penggunaan varietas tahan, dan pemataharian tanah.

Pseudomonas putida strain Pf-20 dilaporkan mampu menekan *R. solanacearum* di laboratorium (Arwiyanto, 1997), menekan penyakit layu di rumah kaca (Arwiyanto dan Hartana, 1999), dan penyakit layu di lapang (Arwiyanto dan Hartana, 2001). Aplikasi agensia hayati di lapang sangat repot dan mahal karena semai yang akan ditanam harus dicelup terlebih dahulu dalam suspensi bakteri antagonis.

Pseudomonas putida pernah diformulasi dalam bentuk penyelubung benih (coated seed) pada tembakau, namun tidak memberikan pengaruh pengendalian sebaik kalau semai dicelup dalam suspensi (Wuryandari et al., 2004). Tulisan ini melaporkan pemanfaatan pupuk kandang sebagai bahan utama medium pembawa bakteri antagonis layu bakteri, untuk penyelimutan benih tembakau. Hasilnya menunjukkan bahwa dengan bahan tersebut, bakteri antagonis dapat bertahan sampai empat minggu dengan kerapatan 2×10^7 upk/benih. Di samping itu, perkecambahan benih tembakau tidak terpengaruh oleh penyelimutan tersebut.

METODE PENELITIAN

Benih Tembakau. Benih tembakau varietas Klemoko digunakan dalam penelitian ini.

Bakteri dan Kondisi Kultur. *P. putida* strain Pf-20 dan pseudomonad berpendar isolat Pf-33 merupakan koleksi Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM. Sebelum digunakan, bakteri ditumbuhkan pada medium King's B pada suhu kamar selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh kemudian dipindah ke agar miring medium King's B. Setelah inkubasi kembali pada suhu kamar selama 24 jam, bakteri siap digunakan.

Pengujian Perkecambahan Benih Tembakau. Benih tembakau yang akan digunakan diuji terlebih dahulu daya kecambahnya dengan cara sebagai berikut. Benih yang bernas dan berukuran seragam didisinfeksi dengan 1% NaOCl selama 30 detik kemudian dikeringanginkan. Benih kemudian diletakkan di atas kertas saring basah

di dalam cawan Petri dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 hari. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase perkecambahan.

Formulasi	Benih	Pupuk kandang	Isolat
F1	2	8	Pf-20
F2	3	7	Pf-20
F3	2	8	Pf-33
F4	3	7	Pf-33
F5	2	8	-Pf-20 & Pf-33
F6	3	7	-Pf-20 & Pf-33
F7	-	8	2
F8	-	7	3

di dalam cawan Petri dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 hari. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase perkecambahan.

Benih bernas dan berukuran seragam didisinfeksi dengan 1% NaOCl selama 30 detik kemudian dikeringanginkan. Benih diletakkan pada cawan Petri, kemudian digoyang agar benih terpisah satu sama lainnya. Suspensi bakteri dalam 0,1% CMC (kerapatan 10^8 upk/ml) disemprotkan pada permukaan benih, kemudian dengan cepat ditaburi pupuk kandang. Campuran yang terbentuk ditekan perlahan dengan kuas dengan arah melingkar atau memutar. Benih yang terselimuti kemudian diambil hati-hati dan dikeringanginkan. Kegiatan tersebut diulang sampai mendapatkan butiran dengan ukuran 1,5–2 mm. Butiran yang terbentuk berupa benih tembakau yang diselimuti dengan bahan tersebut di atas dan disebut sebagai pilen.

Pengujian Kebernasan atau Daya Isi Pilen. Sebanyak 100 butir pilen diletakkan dengan rapi di atas kertas

$$100\% \frac{\text{Persentase daya isi pilen} = \text{Jumlah pilen isi benih}}{\text{Jumlah pilen yang diamati}} \times$$

Persentase pilen berisi satu benih dihitung dengan rumus:

$$100\% \frac{\text{Persentase pilen berisi satu benih} = \text{Jumlah pilen berisi satu benih}}{\text{Jumlah pilen berisi benih}} \times$$

Pengujian Perkecambahan Benih dalam Pilen. Pilen diletakkan di atas kertas saring basah dalam cawan Petri kemudian diletakkan pada suhu kamar selama 10 hari. Persentase perkecambahan kemudian dihitung dengan rumus seperti tersebut di atas.

Pengamatan Populasi Pseudomonad Berpendar dalam Pilen. Sebanyak satu pilen dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi satu ml bufer fosfat pH 7,0. Tabung digojok sampai homogen, kemudian didiamkan selama lima menit. Suspensi yang terjadi kemudian diencerkan per sepuluh kali dengan menggunakan bufer fosfat pH 7,0. Pada tingkat pengenceran tertentu, sebanyak 100

mikroliter suspensi dituang pada permukaan medium King's B, kemudian diratakan dengan drigalski. Setelah inkubasi selama 48 jam pada suhu kamar, koloni yang berpendar dihitung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkecambahan Benih Tembakau Sebelum Diselimuti

Benih tembakau yang dipakai dalam penelitian ini menunjukkan persen perkecambahan yang sangat baik karena mencapai 97%. Pada hari ketiga, benih yang berkecambah mencapai 91%, kemudian pada hari kesepuluh mencapai 97% (Tabel 1). Penyelimutan benih dengan bahan organik maupun anorganik akan memengaruhi kegigasan benih tersebut (Unit Tembakau, 1992; Wuryandari et al., 2004), sehingga sebelum penyelimutan dilakukan, kualitas benih yang diukur dari persen perkecambahannya, sangat perlu diketahui terlebih dahulu. Persen perkecambahan benih yang tinggi sebelum penyelimutan akan menghasilkan pilen dengan persen perkecambahan yang tinggi pula

Tabel 1. Persentase Perkecambahan Benih Tembakau Varietas Klemoko

Pengamatan hari ke-	Persen benih berkecambah					Rerata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	
1	0	0	0	0	0	0
2	16	16	10	10	19	14,2
3	80	66	68	82	84	76,0
4	98	95	88	91	87	91,8
5	98	95	90	94	90	93,4
6	98	97	92	96	95	95,6
7	99	97	95	98	97	97,2
8	99	97	96	98	97	97,4
9	99	97	96	98	97	97,4
10	99	97	96	98	97	97,4

Tabel 2. Kebernasan Pilen dan Persentase Pilen Berisi Satu Benih

Formula*	Kebernasan (%)	Pilen berisi satu benih (%)
F1	67,3	67,3
F2	75,3	83,6
F3	56,6	82,3
F4	58,6	72,1
F5	74,0	90,9
F6	44,0	85,5
F7	52,3	55,4
F8	73,6	69,6

* formula ada di Metode Penelitian

yang baik yaitu kalau daya isi pilennya lebih dari atau sama dengan 90% (Unit Tembakau, 1992). Daya isi pilen yang rendah ini mungkin disebabkan penyelimutan masih sangat sederhana. Sementara itu, pilen yang berisi satu paling banyak ditemukan pada formula F5, sedangkan yang paling rendah ditemukan pada formula F7. Meskipun demikian, kebernasan pilen dan persen pilen berisi satu tidak tergantung pada formula, namun lebih pada metode yang digunakan dalam penyeli-mutan. Penelitian penyelimutan benih sebelum-nya dengan menggunakan bahan anorganik juga memperoleh hasil yang sama, yaitu keber-nasan yang

rendah (Wuryandari et al., 2004).

Daya Kecambah Pilen

Penyelimutan benih dengan bahan dalam penelitian ini tidak menghambat per-kecambahan benih. Pada semua formula yang diteliti menunjukkan persen perkecambahan yang tinggi (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa bahan yang digunakan dalam penye-limutan benih merupakan bahan yang tidak bersifat merusak terhadap benih, demikian pula *P. putida* strain Pf-20 dan pseudomonad berpendar isolat Pf-33 yang dicampur dalam bahan penyelimutan tersebut tidak bersifat patogen terhadap tanaman (Arwiyanto

Tabel 3. Perkecambahan Pilen pada Berbagai Formulasi

Formula	Persen pilen yang berkecambah			Rerata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
F1	90	87	88	88,3
F2	97	89	94	93,3
F3	89	86	98	91,0
F4	90	74	87	83,7
F5	97	91	92	93,3
F6	86	82	96	88,0
F7	91	86	89	88,7
F8	95	99	87	93,7
F9	97	96	97	96,7

tanaman, tetapi dapat memacu pertumbuhan tanaman (Cook and Baker, 1983).

Populasi *Pseudomonad* Berpendar pada Pilen

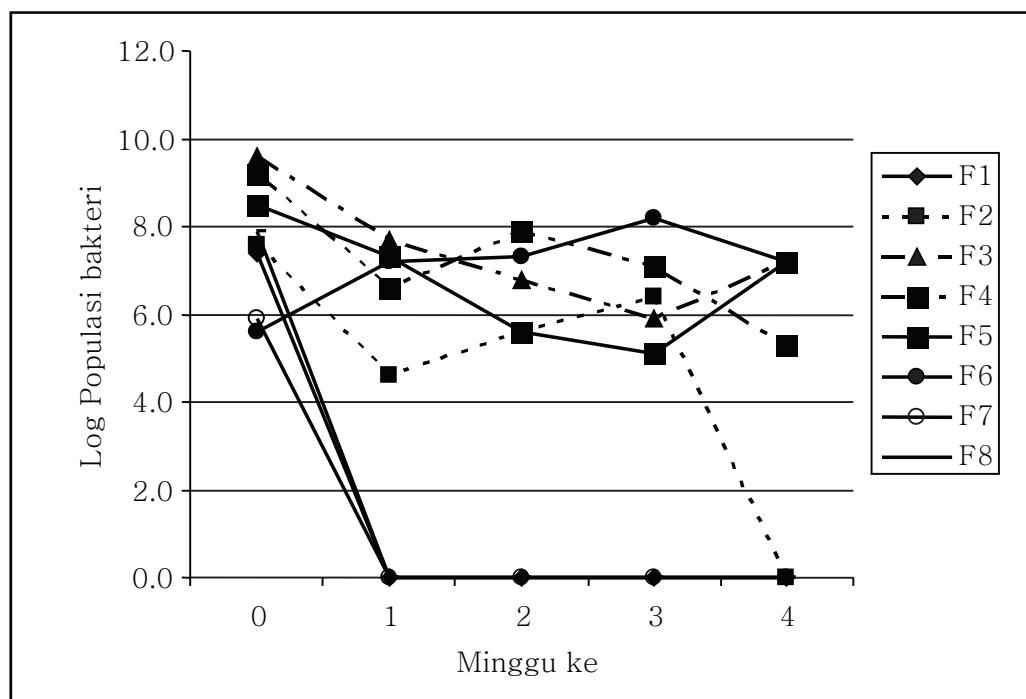
Populasi *pseudomonad* berpendar pada pilen beragam tergantung pada rasio volume suspensi bakteri yang ditambahkan per berat pupuk kandang dan tergantung pada jumlah *pseudomonad* berpendar yang ditambahkan (Gambar 1). Pilen yang bahan penutupannya hanya menggunakan pupuk kandang tanpa tambahan bakteri antagonis, populasi *pseudomonad* berpendar hanya terdeteksi pada saat setelah selesai di selimutkan, yaitu pada formula F7, sebesar 9×10^5 upk (unit pembentuk koloni)/pilen dan F8 sebesar 9×10^7 upk/pilen. Mulai satu minggu kemudian, tidak terdeteksi lagi adanya bakteri *pseudomonad* berpendar.

Meskipun demikian, hal yang sama diperoleh pada formula F1 yang ditambahkan *P. putida* strain Pf-20 sebanyak tiga ml, ternyata populasi *pseudomonad* berpendar tidak terdeteksi lagi setelah satu minggu penutupannya. Pupuk kandang yang digunakan dalam penelitian ini tidak disterilkan terlebih dahulu dan mengandung juga mikroba seperti jamur dan bakteri (Arwiyanto, 2007, dalam penerbitan). Beberapa isolat bakteri yang ada dalam pupuk kandang tersebut ada yang bersifat antagonis terhadap *P. putida* strain Pf-20. Kemungkinan *P. putida* tersebut mengalami penghambatan pertumbuhan oleh mikroba yang ada dalam pupuk kandang. Namun, ketika volume suspensi bakteri yang ditambahkan ke dalam pupuk kandang sebanyak dua ml, bakteri masih mampu bertahan sampai tiga minggu dalam formulasi (F2). Jumlah suspensi yang

lebih sedikit memungkinkan bakteri menyebar lebih merata ke dalam pupuk kandang dengan kepadatan lebih rendah. Hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut karena dengan populasi awal yang rendah ternyata bakteri dapat bertahan lebih lama di dalam pilen.

Pada formula F3, F4, F5, dan F6, *pseudomonad* berpendar masih dapat dideteksi sampai empat minggu setelah penutupannya. Pada minggu pertama, jumlah bakteri menurun karena bakteri memerlukan waktu untuk menyesuaikan diri, sehingga terjadi kematian yang cukup banyak. Pada formula F3 dan F4, penurunan populasi bakteri berlangsung sampai tiga minggu untuk kemudian naik pada minggu keempat. Pada formula F3 dan F4 ini, bakteri yang digunakan adalah *pseudomonad* berpendar isolat Pf-33, ada kemungkinan terjadi antagonisme antara *pseudomonad* berpendar yang ada dalam pupuk kandang dengan *pseudomonad* berpendar isolat Pf-33. Pada periode minggu ketiga sampai keempat, *pseudomonad* berpendar isolat Pf-33 mampu memanfaatkan nutrisi yang ada, sehingga populasinya kemudian naik. *P. putida* strain Pf-20 ternyata dalam pupuk kandang tidak mampu bertahan lama.

Ada kecenderungan apabila dalam pilen ditambahkan dua isolat bakteri, maka keberadaan *pseudomonad* berpendar akan mampu bertahan lebih lama dengan populasi tinggi. Hal ini ditunjukkan pada formula F5 dan F6, meskipun terjadi penurunan populasi *pseudomonad* berpendar pada awalnya, pada akhir pengamatan yaitu pada minggu keempat populasi *pseudomonad* berpendar masih tinggi, yaitu 2×10^7 upk/pilen. Pada kedua formula ini, bakteri yang ditambahkan



Gambar 1. Dinamika populasi pseudomonad berpendar pada pilen dalam berbagai pemformulaan.

terpacu pertumbuhannya dengan adanya eksudat akar yang kaya dengan nutrisi, untuk kemudian tumbuh melakukan pengkolonisasi pada akar. Akar yang sudah terkoloni oleh agensia hayati akan menyebabkan tanaman menjadi lebih tidak mudah diganggu oleh patogen tumbuhan (Bull et al., 1991; Kim et al., 1997). Kegigasan pilen benih tembakau, yang penyelimutannya menggunakan bahan anorganik, masih tinggi sampai lebih dari satu tahun setelah diselimuti (Hartana, komunikasi pribadi). Pada penelitian ini, hasil akhir yang ingin diperoleh adalah bertahannya bakteri agensia hayati pada pilen tanpa melihat periode waktu bertahannya bakteri dalam pilen tersebut. Apabila bakteri hanya bertahan satu bulan setelah diselimuti, maka pesemaian tembakau harus dilakukan dalam periode satu bulan setelah penyelimutan.

KESIMPULAN

Pseudomonad berpendar bertahan hidup pada pilen sampai empat minggu setelah penyelimutan benih apabila dua bakteri antagonis digunakan secara bersamaan dalam satu formula.

DAFTAR PUSTAKA

- Arwiyanto, T. 1995. Strategy of Integrated Control on Tobacco Bacterial Wilt. Paper presented at the Expose Tembakau Deli. December 1995. Medan, Indonesia. In Indonesian.
- . 1997. Biological Control of Tobacco Bacterial Wilt: 1. Isolation of Antagonistic Bacteria. *Journal of Indonesian Plant Protection* 3:54–60.
- Arwiyanto, T. dan I. Hartana. 1999. Pengendalian hayati penyakit layu bakteri tembakau (*Ralstonia*

- . 2001. Percobaan lapangan pengendalian hayati penyakit layu bakteri tembakau (*Ralstonia solanacearum*). *Mediumgama* 3:7-14.
- Bull, C.T., D.M. Weller, and L.S. Thomashaw. 1991. Relation between Root Colonization and Suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology* 81:954-959.
- Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Dalmadiyo, G. 2004. *Kajian Interaksi Infeksi Nematoda Puru Akar (Meloidogyne incognita) dengan Bakteri Ralstonia solanacearum pada Tembakau Temanggung*. Disertasi. Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta. 123p.
- Kim, D.S., D.M. Weller and R.J. Cook. 1997. Population dynamics of *Bacillus* sp L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 87:559-564.
- Semangun, H. 2000. *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Unit Tembakau. 1992. *Teknologi Pembibitan Tembakau dengan Benih Pilen*. PT Perkebunan Nusantara X, Jember.
- Wuryandari, Y., T. Arwiyanto, B. Hadisutrisno, dan I. Hartana. 2004. Daya tahan hidup *Pseudomonas putida* strain Pf-20 dalam beberapa inokulum. *Jurnal Perlindungan Tanaman* 10(1):33-41.