

PENGARUH SUMBER MINERAL TERHADAP PENEKANAN *Erwinia carotovora* OLEH PSEUDOMONAS PENDAR-FLUOR SECARA IN VITRO

Hardian Susilo Addy¹

ABSTRACT

Antimicrobial Stimulation of Fluorescent Pseudomonad to Inhibit Soft-rot Pathogen Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. This research was conducted to study effect of mineral sources on inhibition *Erwinia carotovora* by fluorescent pseudomonad. We used several mineral sources to stimulate antimicrobial substances from fluorescent pseudomonad that responsible to inhibit *E. carotovora* subsp. *carotovora* in vitro. The results showed that zinc 0,5 mM were the best to increase antagonistics of fluorescent pseudomonad againsts *E. carotovora*. Zinc were increased antimicrobial substances twofold compared with control without stimulant agent. Detection of antimicrobial substance using TLC showed that only one antimicrobial was detected with retention factor (Rf) of 0,68 – 0,72. However, identification and characterization of that substance is still needed.

Key words: antimicrobial stimulation, fluorescent pseudomonad, *Erwinia carotovora*, mineral sources.

PENDAHULUAN

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* merupakan salah satu spesies bakteri yang umumnya menyebabkan gejala busuk lunak pada beberapa tanaman hortikultura (Schaad *et al.*, 2001). Bakteri ini memiliki kisaran inang yang sangat banyak dan dapat menginfeksi tanaman dalam penyimpanan (Goto, 1992). Dampak yang disebabkan oleh bakteri patogen tersebut sangat serius (Semangun, 1991). Bakteri ini merupakan patogen terbawa tanah yang sulit dikendalikan secara kimiawi (Arwiyanto & Hartana, 1999) dan penyebarannya sangat cepat.

Kondisi di atas memberikan gagasan untuk melakukan pengendalian secara biologi dengan memanfaatkan agensia pengendali hayati karena dianggap lebih efektif dan ramah lingkungan (Kloepper, 1993). Bakteri risosfer seperti pseudomonas pendar-fluor telah banyak digunakan sebagai agensia pengendali hayati patogen tumbuhan (Arwiyanto, 1997; Compant *et al.*, 2005). Pemanfaatan pseudomonas pendar-fluor sebagai agensia pengendali hayati telah banyak dilakukan karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antimikrobia (Whippes, 2001; de Boer *et al.*, 2003; Kazempour, 2004).

Mekanisme antagonistik agensia pengendali hayati berbeda-beda tergantung pada genus, spesies dan strain bakteri antagonis maupun patogennya

(Whippes, 2001; Addy, 2005). Produksi senyawa antimikrobia berhubungan dengan kemampuan suatu bakteri antagonis yang secara genetik biosintesis senyawa tersebut melibatkan lebih dari satu gen (Sigee, 1993) dengan regulasi yang berbeda tergantung pada jenis senyawa antimikrobia yang dihasilkan (Poole & McKay, 2003).

Pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa regulasi masing-masing jenis senyawa antimikrobia ini berhubungan erat dengan sumber mineral (Duffy & Defago, 1999). Antibiotik 2,4-diasetilfloroglucinol yang diproduksi oleh *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 dan *P. fluorescens* F113 (Duffy *et al.*, 2004; Whippes, 2001) dapat distimulasi dengan penambahan mineral zeng dan amonium molybdate (Duffy & Defago, 1999).

Namun informasi tentang pengaruh sumber mineral dalam mekanisme penghambatan masih kurang diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh sumber mineral terhadap kemampuan pseudomonas pendar-fluor untuk menekan *E. carotovora*.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri. Bakteri patogen busuk lunak (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) dan bakteri pseudomonas pendar-fluor dari risosfer tanaman kubis diisolasi dari tanaman kubis pada

¹Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
Jl. Kalimantan 37 Jember 68121. e-mail : hsaddy@faperta.unej.ac.id

medium NA (*Nutrient Agar*) dan King's B. Koloni yang tumbuh kemudian diidentifikasi dan diuji virulensi serta patogenesitasnya mengikuti Fahy and Hayward (1983) dan Schaad *et al.* (2001).

Larutan Mineral dan Medium Pengujian. Sumber mineral yang digunakan adalah seng sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), kobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), amonium molybdate ($\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6\text{O}_{24} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dan besi sulfat ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ditambahkan pada medium uji KB volume 10 ml dengan konsentrasi akhir 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM dan 1,0 mM sedangkan kontrol berupa medium uji tanpa penambahan mineral. Setelah itu medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

Uji Antagonistik Pseudomonas Pendar-fluor terhadap E. carotovora. Uji antagonistik dilakukan untuk mengetahui pengaruh stimulan terhadap daya antagonistik pseudomonas pendar-fluor dalam mengendalikan patogen busuk lunak (*E. carotovora* subsp. *carotovora*). Pengujian dilakukan dengan metode *double layer agar*. Bakteri antagonis ditumbuhkan pada medium uji (King's B yang mengandung stimulan) dalam petridishh, masing-masing petridish 4 titik biakan, kemudian menginkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Setelah inkubasi petridish dibalik dan pada tutupnya ditetesi dengan 1 ml kloroform dan dibiarkan selama 2 jam hingga semua kloroform menguap kemudian petridish dibalik seperti keadaan semula. Sebanyak 0,2 ml suspensi *E. carotovora* subsp. *carotovora* yang berumur 24 jam dicampur dengan 4 ml agar air 0,6 % suhu 50°C , dan dituang di atas biakan bakteri antagonis. Hasilnya kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan didasarkan pada luas zona penghambatan yang terbentuk. Hasil terbaik dari masing-masing perlakuan konsentrasi dipilih untuk pengujian selanjutnya.

Produksi Senyawa Antimikrobia Pseudomonas Pendar-fluor. Masing-masing konsentrasi larutan stimulan baik sumber karbon maupun mineral terbaik dari hasil uji sebelumnya ditambahkan pada medium King's B cair pada tabung (volume 5 ml). Sebanyak 1 ml suspensi bakteri antagonis (*pseudomonas pendar-fluor*) dituang ke dalam medium tersebut dan diinkubasikan selama 48 jam dengan menggunakan *rotary shaker*. Filtrat kultur bakteri yang mengandung

senyawa antimikrobia ini diambil dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 2000 G selama 10 menit dan disterilkan dengan mikrofilter 0,22 mM. Hasil filtrasi ditampung dalam erlenmeyer untuk pengujian daya hambat senyawa antimikrobia.

Pengujian Daya Hambat Senyawa Antimikrobia. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui besarnya peningkatan daya hambat senyawa antimikrobia *pseudomonas pendar-fluor* untuk menghambat perkembangan bakteri patogen busuk lunak *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Pengujian ini dilakukan dengan cara meneteskan filtrat masing-masing perlakuan pada pengenceran yang mengikuti nilai *Arbitrary Unit* (AU) (Klement *et al.*, 1990).

Sebanyak 1 ml suspensi bakteri *E. carotovora* subsp. *carotovora* ditetaskan dalam 9 ml medium NBA (*Nutrient Broth Agar*) yang belum membeku dan divortek lalu dituang dalam petridishh untuk pengujian daya hambat. Masing-masing filtrat perlakuan diencerkan mengikuti nilai AU yaitu $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ dan $\frac{1}{64}$ sedangkan kontrol adalah air steril. Sebanyak 500 μl filtrat bakteri antagonis dari perlakuan pengenceran ditetaskan pada permukaan medium NBA yang mengandung bakteri patogen *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Pengamatan zona bening pada daerah tetesan filtrat dilakukan setelah 24 jam untuk mengetahui kemampuan senyawa antimikrobia dalam menghambat *E. carotovora* subsp. *carotovora*.

Ekstraksi dan Deteksi Senyawa Antimikrobia. Untuk mengetahui jumlah macam senyawa antimikrobia yang distimulasi maka dilakukan ekstraksi dan deteksi senyawa antimikrobia dari bakteri antagonis *pseudomonas pendar-fluor*. Ekstraksi senyawa antimikrobia bakteri antagonis dilakukan dengan mengikuti Duffy & Defago (1999). Filtrat kultur bakteri pada medium cair uji yang mengandung stimulan dengan konsentrasi terbaik sebanyak 20 ml diambil dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 2000 G untuk memisahkan bakteri dengan metabolitnya yang terdifusi ke dalam medium cair, kemudian pH nya diatur menjadi pH 2 dengan menambahkan 700 μl HCl 1 M. Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 20 ml etil asetat pada supernatan lalu digojok dengan *rotary shaker* selama 30 menit pada 150-200 rpm. Tahap pemisahan antara substansi metabolit yang

terlarut dan tidak terlarut dipercepat dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 2000 G. Fase pelarut organik dipindahkan pada labu evaporator dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu yang terbentuk dilarutkan dengan 1 ml metanol.

Deteksi senyawa antimikrobia bakteri antagonis dengan *Thin Layer Chromatography* dan uji daya hambat ekstrak menggunakan plat *Aluminium silica gel 60 F₂₅₄* berukuran 117 mm x 40 mm. Pengujian dilakukan dengan meneteskan 5 µL masing-masing ekstrak menggunakan pipa kapiler 5 µL dengan jarak antar sampel 1 cm, 1 cm dari sisi bawah dan 0,5 cm dari sisi samping. Setelah itu plat TLC dikembangkan dalam larutan pengembang berupa metanol : air (60 : 40) setinggi 1 cm dari sisi bawah dan dibiarkan mengembang hingga 1 cm dari sisi atas. Plat dibiarkan mengering dan diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 362 nm lalu ditandai noda senyawa yang terbentuk (berwarna ungu berpendar) dan dihitung nilai faktor retensinya (R_f = perbandingan jarak munculnya noda dengan jarak yang ditempuh larutan pengembang).

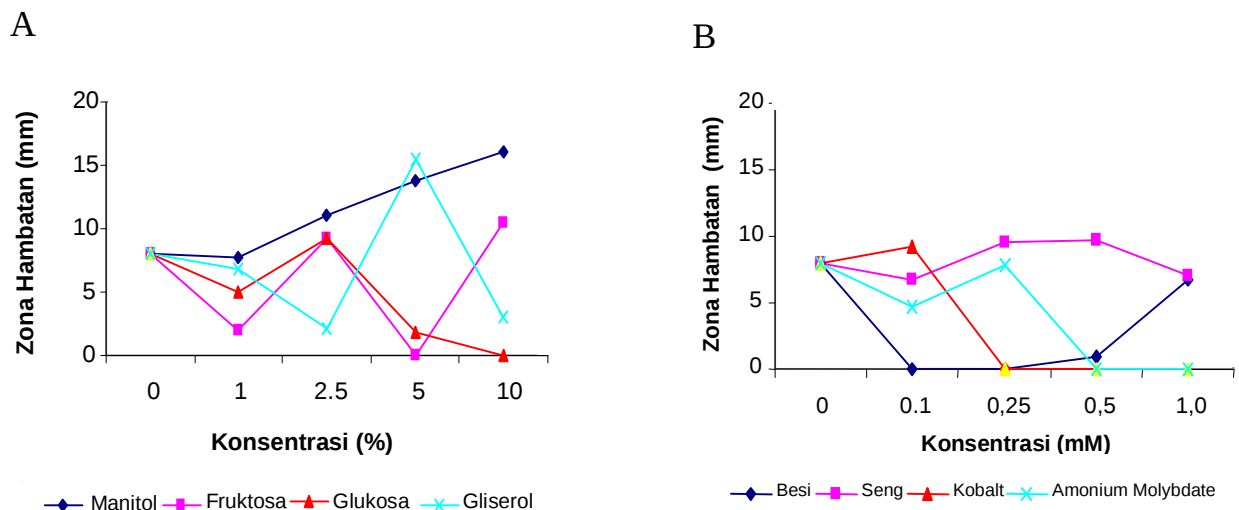
Untuk mengetahui jumlah macam senyawa antimikrobia dilakukan uji daya hambat masing-masing noda pada R_f tertentu dengan cara mengerok

tiap noda dan disuspensikan dalam 1 ml air steril (4 ulangan noda dalam 1 ml air steril). Suspensi noda selanjutnya ditetaskan pada media NA yang telah ditaburi dengan suspensi *E. carotovora subsp. carotovora* dan diinkubasikan selama 24 jam. Suspensi yang menampilkan zona bening menunjukkan bahwa suspensi tersebut mengandung senyawa antimikrobia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh stimulan terhadap kemampuan antagonistik pseudomonas pendar-fluor dalam mengendalikan patogen busuk lunak (*E. carotovora subsp. carotovora*). Pengaruh stimulan terhadap kemampuan antagonistik pseudomonas pendar-fluor (PF) untuk mengendalikan patogen busuk lunak (*E. carotovora subsp. carotovora* (Ecc)) disajikan dalam Gambar 1.

Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh bahan stimulan dan konsentrasi terhadap kemampuan PF untuk menghambat Ecc secara *in vitro*. Secara umum pengaruh sumber karbon lebih besar dibandingkan dengan sumber mineral terhadap daya antagonis PF yang ditandai dengan besarnya zona hambatan masing-masing mencapai 16 mm dan



Gambar 1. Pengaruh stimulan sumber karbon (A) dan sumber mineral (B) terhadap kemampuan penghambatan pseudomonas pendar-fluor terhadap *Erwinia carotovora subsp. carotovora* secara *in vitro* pada beberapa konsentrasi. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat kali.

9,75 mm dibandingkan dengan kontrolnya yaitu 8 mm. Kemampuan penghambatan yang terjadi ditunjukkan dengan adanya pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri *pseudomonas pendar-fluor*.

Hasil menunjukkan bahwa sumber karbon yang berbeda berpengaruh terhadap kemampuan penghambatan PF terhadap Ecc. Sumber karbon berupa manitol merupakan stimulan senyawa antimikrobia PF terbaik dibandingkan sumber karbon lainnya yang ditunjukkan dengan besarnya zona hambatan yang terbentuk pada media yang mengandung manitol. Hasil juga menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi manitol makin tinggi daya hambatnya. Sebaliknya makin tinggi konsentrasi gliserol makin rendah kemampuan penghambatan PF terhadap Ecc. Manitol dengan konsentrasi 10% merupakan konsentrasi terbaik untuk meningkatkan kemampuan penghambatan PF terhadap Ecc yaitu 16 mm sedangkan gliserol pada konsentrasi yang sama menyebabkan tidak tampaknya zona hambatan yang dibentuk oleh PF terhadap Ecc.

Pengaruh sumber mineral terhadap kemampuan penghambatan PF secara umum berbeda tergantung pada konsentrasinya. Hasil menunjukkan bahwa pengaruh konsentrasi besi dan seng berbeda dengan amonium molibdate dan kobalt. Makin tinggi konsentrasi besi dan seng hingga 1,0 mM makin besar zona hambatan yang terbentuk. Sebaliknya, makin tinggi konsentrasi amonium molibdate dan kobalt makin rendah zona hambatan yang terbentuk. Hasil juga menunjukkan bahwa sumber mineral berupa seng dengan konsentrasi 0,5 mM merupakan stimulan senyawa antimikrobia terbaik dari sumber mineral yang diujikan yaitu dengan zona hambatan sebesar 9,75 mm. Dengan demikian sumber karbon berupa manitol dengan konsentrasi 10% dan sumber mineral berupa seng dengan konsentrasi 0,5 mM merupakan

sumber bahan stimulan yang terbaik untuk digunakan pada pengujian selanjutnya.

Peningkatan Daya Hambat Senyawa Antimikrobia *Pseudomonas Pendar-fluor*. Larutan stimulan berupa sumber karbon dan sumber mineral masing-masing berupa manitol 10 % dan seng 0,5 mM berpengaruh terhadap nilai *arbitrary unit* (AU). Arbitrary unit merupakan nilai pengenceran tertinggi suatu larutan antimikrobia yang masih mampu memiliki penghambatan terhadap organisme targetnya. Hasil menunjukkan bahwa metabolit bakteri pada filtrat kultur dari medium tumbuh yang mengandung larutan stimulan berupa sumber karbon dan sumber mineral yang diujikan (manitol 10% dan seng 0,5 mM) memiliki nilai AU yang sama dan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrolnya (Tabel 1).

Nilai AU dari filtrat kultur pada media yang mengandung manitol 10% dan seng 0,5 mM masing-masing adalah $\frac{1}{4}$ yang menunjukkan bahwa filtrat kultur masih memiliki kemampuan penghambatan meskipun kandungannya hanya 25% dalam air steril dibandingkan dengan kontrolnya yang memiliki nilai AU hanya $\frac{1}{2}$ atau kandungan filtrat kulturnya 50% dalam air steril. Hal ini menunjukkan bahwa larutan stimulan berupa manitol 10% dan seng 0,5 mM mampu meningkatkan produksi senyawa antimikrobia dalam filtrat kultur (metabolit bakteri) hingga 2 kali lipat lebih banyak dibandingkan kontrolnya (tanpa penambahan larutan stimulan).

Jumlah Senyawa Antimikrobia *Pseudomonas Pendar-fluor* yang distimulasi. Metabolit ekstraselular yang dimiliki oleh *pseudomonas pendar-fluor* sangat beraneka ragam. Diketahui bahwa senyawa-senyawa antimikrobia yang terkandung dalam ekstrak metabolit dapat dipisahkan satu sama

Tabel 1. Daya hambat filtrat kultur *pseudomonas pendar-fluor* pada media tumbuh yang mengandung larutan stimulan terhadap *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

Larutan Stimulan	Nilai Arbitrary Unit (AU)						
	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Manitol 10 %	^a	+	+	-	-	-	-
Seng 0,5 mM	+	+	+	-	-	-	-
Kontrol	+	+	-	-	-	-	-

Keterangan : ^a Tanda (+) menunjukkan ada zona hambatan, (-) tidak ada zona hambatan. Masing-masing perlakuan di ulang 3 (tiga) kali

lain dengan kromatografi seperti TLC. Hasil menunjukkan bahwa pemisahan senyawa antimikrobia PF dengan TLC tampak berupa noda-noda yang berwarna ungu terang jika diamati di bawah sinar ultraviolet. Namun perlu dilakukan pengujian lebih lanjut untuk memastikan senyawa yang berupa antimikrobia dengan melakukan uji daya hambat tiap noda. Pada Tabel 2. ditunjukkan bahwa terdapat 7 noda senyawa pada masing-masing perlakuan dengan nilai Rf (faktor retensi) yang bervariasi berkisar 0,08 – 0,85.

Berdasarkan hasil uji daya hambat noda tampak bahwa substansi senyawa dengan faktor retensi berkisar 0,68-0,72 mengandung senyawa antimikrobia yang berperan dalam mengendalikan *Ecc*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penghambatan yang dibentuk oleh noda pada faktor retensi tersebut (Tabel 2).

Pseudomonas pendar-fluor (*fluorescent pseudomonads*) merupakan kelompok bakteri yang banyak digunakan sebagai agensia pengendali hayati dan dikenal pula sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Sigee, 1993). Kemampuan kelompok bakteri menghasilkan senyawa antimikrobia merupakan salah satu faktor penting sebagai agensia pengendali hayati. Senyawa antimikrobia yang dihasilkan secara *in vitro* ditunjukkan dengan besar kecilnya zona hambatan yang terbentuk di sekitar koloni bakteri agensia hayati yang diujikan (Sigee, 1993).

Sumber karbon dan mineral secara umum diperlukan oleh mikroba untuk pertumbuhan dan

perkembangannya (Goto, 1992). Keduanya sangat berpengaruh terhadap produksi senyawa antimikrobia, transkripsi dan promosi biosintesis, dan ketersediaan nutrisi dan pH selain menjaga integritas sel, sebagai katalisator enzim dan protein (Weinberg, 1977).

Pengujian pengaruh sumber karbon dan sumber mineral terhadap kemampuan penghambatan *pseudomonas pendar-fluor* terhadap *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* menunjukkan bahwa masing-masing sumber karbon dan sumber mineral mampu mempengaruhi produksi senyawa antimikrobia. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa antimikrobia dapat distimulasi dengan penambahan sumber karbon maupun sumber mineral tertentu. Engelhard (1989) mengatakan bahwa sumber karbon dan sumber mineral dapat menstimulasi pembentukan antibiotik oleh bakteri antagonis.

Sumber karbon yang diujikan berupa manitol, fruktosa, glukosa dan gliserol maupun sumber mineral berupa besi, seng, kobalt dan amonium molibdate menunjukkan bahwa masing-masing memiliki peran yang berbeda dalam menstimulasi produksi senyawa antimikrobia. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan pembentukan zona hambatan oleh *pseudomonas pendar-fluor* terhadap *E. carotovora* subsp. *carotovora* pada medium uji tergantung pada konsentrasi sumber karbon maupun sumber mineralnya. Luasnya zona hambatan yang terbentuk menunjukkan bahwa larutan stimulan yang digunakan mampu menstimulasi pembentukan senyawa antimikrobia dengan baik, sebaliknya kecil atau tidak adanya pembentukan zona hambatan menunjukkan

Tabel 2. Nilai faktor retensi (Rf), keberadaan dan daya hambat senyawa *pseudomonas pendar-fluor* terhadap *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* yang dianalisis dengan TLC dan Uji daya hambat noda

Nomor urut noda	Nilai Rf	Keberadaan dan daya hambat senyawa yang distimulasi dengan		
		Manitol 10%	Seng 0,5 mM	Kontrol
1	0,08	+ ^a / NIz ^b	+ / NIz	+ / NIz
2	0,24	+ / NIz	+ / NIz	+ / NIz
3	0,41 – 0,45	+ / NIz	+ / NIz	+ / NIz
4	0,51 – 0,53	+ / NIz	+ / NIz	+ / NIz
5	0,68 – 0,72	+ / Iz	+ / Iz	+ / Iz
6	0,76 – 0,81	+ / NIz	+ / NIz	+ / NIz
7	0,85	+ / NIz	-	-

Keterangan : ^a (+) menunjukkan munculnya noda; (-) menunjukkan tidak adanya noda,

^b NIz: menunjukkan tidak ada penghambatan; Iz: menunjukkan adanya penghambatan

bahwa larutan stimulan juga dapat menghambat pembentukan senyawa antimikrobia bahkan dapat membunuh bakteri antagonis. Duffy and Defago (1999) menemukan bahwa senyawa antimikrobia berupa pyoluteorin dan pyrrolnitrin oleh *Pseudomonas fluorescens* CHA0 dapat ditingkatkan dengan penambahan seng, manitol maupun glukosa, sebaliknya seng secara terpisah dapat menekan pembentukan antibiotik berupa pyoluteorin. Selain itu tingginya konsentrasi besi, kobalt dan amonium molibdate dapat menghambat bahkan membunuh bakteri yang ditunjukkan dengan kecil atau tidak adanya zona hambatan. Hal ini diduga karena sumber mineral tersebut merupakan logam berat yang pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan kematian bakteri. Daly *et al.* (1997) menyatakan bahwa makin tinggi konsentrasi sumber mineral makin rendah jumlah bakteri *P. aeruginosa*. Sigee (1993) menyatakan bahwa makin tersedianya besi dalam media tumbuh bakteri menyebabkan hilangnya kemampuan pembentukan antimikrobia berupa siderofor. Di samping itu, tingginya konsentrasi mineral atau logam berat dapat menyebabkan kematian bakteri akibat terjadinya lisis (Dopson *et al.*, 2003).

Penambahan manitol 10% dan seng 0,5 mM diduga sebagai penyebab meningkatnya nilai *arbitrary unit* (AU) atau nilai pengenceran terakhir terhadap suatu larutan antimikrobia yang masih efektif. Dugaan ini sesuai dengan penemuan Duffy and Defago (1999) bahwa penambahan seng atau manitol dalam media biakan dapat meningkatkan produksi antimikrobia pyoluteorin dibandingkan dengan kontrolnya. Tingginya nilai AU dari filtrat kultur yang diperoleh dari penambahan manitol maupun seng menunjukkan bahwa kedua larutan ini mampu meningkatkan produksi senyawa antimikrobia maupun aktivitas penghambatannya dibandingkan dengan tanpa penambahan kedua larutan tersebut.

Jumlah senyawa antimikrobia yang dapat distimulasi oleh sumber karbon atau sumber mineral sangat berbeda-beda tergantung pada jenis bakteri maupun jenis sumber karbon dan mineral. Diketahui bahwa dua spesies bakteri antagonis yang berbeda akan menghasilkan senyawa antimikrobia yang berbeda pula (Jo Handelsman & Stabb, 1996). Hasil analisa ekstrak metabolit *pseudomonas* pendar-fluor dengan TLC dan uji daya hambat noda menunjukkan bahwa hanya satu substansi yang merupakan senyawa

antimikrobia yang terkandung dalam ekstrak. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan oleh senyawa hasil pemisahan dengan plat TLC yang berupa noda ketika diujikan pengaruh daya hambatnya terhadap *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Masih belum jelas jenis dan karakteristik senyawa antimikrobia tersebut sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Menurut Duffy and Defago (1999) bahwa sumber karbon dan sumber mineral dapat meningkatkan senyawa antimikrobia berupa 2,4-diasetilfluoroglusinol, pyoluteorin, and pyrrolnitrin dan siderofor berupa asam salisilat dan pyochelin oleh *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0.

SIMPULAN DAN SARAN

Larutan stimulan berupa manitol 10% dan seng 0,5 mM merupakan larutan stimulan terbaik untuk meningkatkan kemampuan penghambatan *pseudomonas* pendar-fluor terhadap *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Peningkatan daya hambat senyawa antimikrobia yang distimulasi dengan manitol dan seng masing-masing dua kali lipat lebih besar dibandingkan dengan kontrolnya. Terdapat satu jenis senyawa antimikrobia yang distimulasi oleh manitol dan seng. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis dan karakteristik senyawa antimikrobia yang distimulasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H.S. 2005. Mekanisme Antagonistik Bakteri *Pseudomonas* Pendar-fluor terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora*. Tesis S2. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Arwiyanto, T. 1997. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Bakteri Tembakau : 1. Isolasi Bakteri Antagonis. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 3 (1): 54 – 60.
- Arwiyanto, T & I. Hartana. 1999. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Bakteri Tembakau : 2. Percobaan Di Rumah Kaca. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 5 (1): 50 – 59.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, & E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting

- bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Daly, J.S., R.A. Dodge, R.H. Glew, D.T. Soja, B.A. Deluca, & S. Hebert. 1997. Effect of zinc concentration in mueller-hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. *American Society for Microbiology* 35:1027-1029.
- de Boer, M., P. Bom, F. Kindt, J.J.B. Keurentjes, L. van der Sluis, L.C. van Loon, & P.A.H.M. Bakker. 2003. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strain that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93:626-632.
- Dopson, M., C.B. Austin, P.R. Koppineedi, & P.L. Bond. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149:1959-1970.
- Duffy, B.K. & G. Défago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2429-2438.
- Duffy, B. K., C. Keel, & G. Défago. 2004. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1836-1842.
- Engelhard, A.W. 1989. *Soilborne Plant Pathogens: Management of Diseases with Macro- and Microelements*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
- Fahy, P.C. & A.C. Hayward. 1983. Media and Methods for Isolations and Diagnostic Test. Pages. 337-374 in : Fahy P.C. & G.J. Persley, eds. *Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide*. New York. Academic Press, USA.
- Goto. M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Acad. Press. Inc., Tokyo, Japan.
- Jo Handelsman & E.V. Stabb, 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8:1855-1869.
- Kazempour, M.N. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology Journal* 3:88-96
- Klement, Z., K. Rudolph, & D.C. Sands. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kado. Budapest.
- Kloepper, J.W. 1993. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents*. Auburn University. Alabama.
- Poole, K & G.A. McKay. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: Many roads lead to Rome. *Frontiers in Bioscience* 8: 661-686.
- Schaad, N., J. Jones, & W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd Edition. APS Press. Amerika.
- Schnider, U., C. Keel, C. Blumer, J. Troxler, G. Défago, & D. Haas. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* 177:5387-5392
- Semangun, H. 1991. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Sigee, D.C. 1993. *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspect*. Cambridge University Press. Cambridge.

- Weinberg, E. D. 1977. Mineral Element Control of Microbial Secondary Metabolism in: Weinberg, E.D., eds. *Microorganisms and minerals*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- Whippes, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511.