

ENZIM AMILASE SEBAGAI KOMPONEN ANTAGONIS *BACILLUS SUBTILIS* B315 TERHADAP *RALSTONIA SOLANACEARUM* KENTANG

Nur Prihatiningsih & Heru Adi Djatmiko

Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman Kampus Karangwangkal
Jl. Dr. Suparno Purwokerto 52123
E-mail: prihatiningsihnur@gmail.com

ABSTRACT

Enzyme amylase as an antagonist component of *Bacillus subtilis* B315 against potato *Ralstonia solanacearum*. One of the antagonist mechanism of *Bacillus subtilis* B315 is that it produced secondary metabolites. Enzyme amylase is produced by *B. subtilis* B315 as a secondary metabolite. The aims of the research were: (1) to test mechanism of antagonistics by *B. subtilis* B315 against potato *Ralstonia solanacearum* and (2) to detect antibiosis activity of *B. subtilis* B315. The research was conducted in the Laboratory of Plant Protection Agriculture Faculty and Laboratory of Integrated Research of Jenderal Soedirman University from April to October 2014. The research method is an experimental with growing double layer of *B. subtilis* B315 in YPGA medium and *Ralstonia solanacearum* in water agar. This research used a Completely Randomized Design with 3 treatments and 8 replications. The treatments were *B. subtilis* B1, *B. subtilis* B46 and *B. subtilis* B315. The activity of antibiosis was tested by amylase activity enzyme and than it was analyzed using FTIR (Fourier Transform-infra Red). Result of the research showed that *B. subtilis* B315 could suppress *R. solanacearum* growth with 14 mm inhibition zone. Antibiosis activity of *B. subtilis* B315 as biological agents was showed by the production of amylase enzyme by activity of 0,802 unit/ml. Analysis by FTIR was showed by the production of compound group of alkane, aldehyde, ketones, carboxylic acid, ester, amina, and amida.

Key words: amylase, *Bacillus subtilis* B315, *Ralstonia solanacearum*

ABSTRAK

Enzim amilase sebagai komponen antagonis *Bacillus subtilis* B315 terhadap *Ralstonia solanacearum* kentang. Salah satu mekanisme antagonistik dari *Bacillus subtilis* B315 adalah antibiosis yaitu dihasilkannya metabolit sekunder. Beberapa contoh metabolit sekunder adalah enzim amilase, protease, chitinase dan lipase. Tujuan penelitian ini adalah: (1) menguji mekanisme antagonistik *B. subtilis* B315 terhadap *R. solanacearum* kentang dan (2) mendeteksi aktivitas antibiosis dari *B. subtilis* B315. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Perlindungan Tanaman Fakultas Pertanian Unsoed dan di Laboratorium Riset Terpadu Unsoed dari bulan April sampai dengan Oktober 2014. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan menumbuhkan secara berlapis *B. subtilis* B315 dalam medium YPGA dan *R. solanacearum* dalam agar air. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan 3 perlakuan dan 8 ulangan. Perlakuan 1 adalah *B. subtilis* B1, perlakuan 2 adalah *B. subtilis* B46 dan perlakuan 3 adalah *B. subtilis* B315. Pengujian aktivitas antibiosis dilakukan dengan mengamati aktivitas enzim amilase dan selanjutnya mengekstrak *B. subtilis* B315 dengan etil asetat, untuk mendeteksi enzim yang dihasilkan yang dianalisis dengan FTIR (*Fourier Transform-infra Red*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. subtilis* B315 mampu menekan pertumbuhan *R. solanacearum* dengan zona hambatan 14 mm. Aktivitas antibiosis *B. subtilis* B315 sebagai agensia hayati ditunjukkan dengan dihasilkannya enzim amilase dengan aktivitas 0,802 unit/ml. Hasil analisis dengan FTIR menunjukkan bahwa *B. subtilis* B315 menghasilkan senyawa kelompok alkana, aldehid, keton, asam karboksilat, ester, amina, dan amida.

Kata kunci: amilase, *Bacillus subtilis* B315, *Ralstonia solanacearum*

PENDAHULUAN

Bacillus subtilis mewakili bakteri Gram positif sebagai contoh mikroba antagonis yang berperan sebagai agensia pengendali hayati. *B. subtilis* adalah bakteri antagonis yang diketahui mampu mengendalikan

beberapa patogen baik jamur maupun bakteri, dengan cara menghambat pertumbuhannya (Chen *et al.*, 2012). Bakteri patogen yang telah diketahui terhambat pertumbuhannya oleh *B. subtilis* adalah *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan *Ralstonia solanacearum* (Agustiansyah *et al.*, 2013).

Mekanisme pengendalian oleh *B. subtilis* sebagai aktivitas langsung yaitu antibiosis, parasitisme dan penginduksi ketahanan tanaman terhadap patogen serta kompetisi langsung (Janisiewicz *et al.*, 2000). Mekanisme antibiosis terlihat dengan terbentuknya zona hambatan, yang menunjukkan adanya suatu senyawa yang dihasilkan sebagai metabolit sekunder dan berfungsi sebagai aktivitas antibiosis. Senyawa tersebut berupa enzim, toksin, dan antibiotik (Prihatiningsih & Djatmiko, 2014). Menurut Morikawa (2006), *B. subtilis* mensekresikan enzim amilase, protease, pullulanase, chitinase, xylanase, dan lipase.

Penyakit layu bakteri disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* yang menyerang hampir 200 spesies tanaman dan lebih dari 50 famili (Hayward, 1991). Penyebaran penyakit layu bakteri sangat luas, karena patogennya mempunyai kisaran inang luas, termasuk patogen tular tanah. Hal inilah yang menyebabkan penyakit layu bakteri sulit dikendalikan (Hayward, 1991; Muthoni *et al.*, 2010). Semula nama bakteri layu ini adalah *Pseudomonas solanacearum*, namun sejak tahun 1995 disebut *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995). Penyakit layu bakteri pada tanaman kentang merupakan penyakit penting kedua setelah hawar daun oleh jamur *Phytophthora infestans* di daerah tropis dan sub-tropis (Champoiseau *et al.*, 2010). Kerugian hasil karena penyakit layu bakteri dapat mencapai 50–100%, dan dapat menyebabkan kematian tanaman (Muthoni *et al.*, 2010).

Tujuan penelitian ini adalah (1) menguji mekanisme antagonistik *B. subtilis* B315 terhadap *R. solanacearum* kentang dan (2) mendeteksi aktivitas antibiosis dari *B. subtilis* B315.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Perlindungan Tanaman Fakultas Pertanian dan Laboratorium Riset Terpadu Unsoed selama 6 bulan yaitu mulai April sampai dengan Oktober 2014.

Isolat Bakteri *B. subtilis* dan *R. solanacearum*. Isolat *B. subtilis* yang digunakan adalah *B. subtilis* B1, B46 dan B315. *B. subtilis* B1 diisolasi dari rizosfer padi, sedangkan B46 dan B315 diisolasi dari rizosfer tanaman kentang sehat. *R. solanacearum* yang digunakan berasal dari tanaman kentang layu. Media yang digunakan untuk memelihara isolat bakteri *B. subtilis* adalah YPGA (*yeast pepton glucose agar*) dan YP (*yeast pepton*) cair, dan untuk *R. solanacearum* adalah CPG-TTC (*casamino acid pepton glucosa-triphenyl*

tetrazolium chloride) (Lelliot & Stead, 1987; Goto, 1992).

Pengujian Penghambatan *B. subtilis* *in vitro*. Pengujian penghambatan *B. subtilis* terhadap *R. solanacearum* *in vitro* dilakukan dengan perlakuan 3 isolat *B. subtilis* B1, B46 dan B315 menggunakan metode yang dikemukakan oleh Ghosh *et al.* (2007) dengan dua lapis medium. Perlakuan ini diulang 8 kali menggunakan Rancangan Acak Lengkap.

Aktivitas Antibiosis *B. subtilis* B315 terhadap *R. solanacearum*. Setelah pengujian *in vitro* diketahui bahwa *B. subtilis* mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*, maka selanjutnya dilakukan uji amilase dengan menggoreskan koloni *B. subtilis* B315 pada medium hidrolisis pati (Lelliot & Stead, 1987). Analisis enzim amilase yang dihasilkan *B. subtilis* B315 dilakukan setelah mendapatkan persamaan regresi dari nilai absorbansi larutan standar glukosa. Aktivitas enzim amilase dihitung berdasarkan persamaan regresi linear larutan standar glukosa dengan memasukkan nilai absorbansi sampel, lama inkubasi dan jumlah enzim yang digunakan. Kemudian aktivitas enzim amilase dihitung berdasarkan inkubasi selama 30 menit dan diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 275 nm. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan etil asetat untuk melihat senyawa apa yang dihasilkan oleh *B. subtilis* B315 sebagai karakter aktivitas antibiosis (Kumar *et al.*, 2009).

B. subtilis B315 ditumbuhkan pada medium YP cair digojog selama 3 hari dengan kecepatan 250 rpm, kemudian disentrifuse pada suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan bebas sel yang diperoleh diekstrak dengan etil asetat, kemudian diuapkan dengan vacuum rotary evaporator pada suhu 77 °C. Crude extract kemudian dideterminasi gugus fungsinya sebagai senyawa antibakteri dengan FTIR (*Fourier Transform Infra-red Spectrum*) pada bilangan gelombang 4000-1200 (cm⁻¹). Deteksi gugus fungsi dilakukan dengan FTIR yang menunjukkan aktivitas *B. subtilis* B315 sebagai mekanisme antibiosis dalam pengendalian patogen, seperti metode yang dilakukan oleh Kumar *et al.* (2009) untuk mendeteksi senyawa antifungal yang dihasilkan oleh *B. subtilis* MTCC-8114.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penghambatan pertumbuhan *R. solanacearum* oleh *B. subtilis* B315 dapat dilihat dalam Tabel 1. Tiga isolat *B. subtilis* menunjukkan perbedaan sangat nyata

pada penghambatan terhadap *R. solanacearum*. *Bacillus subtilis* B315 menunjukkan penghambatan terbaik terhadap *R. solanacearum* dengan zona hambatan 14 mm.

Zona hambatan yang terbentuk menunjukkan bahwa mekanisme *B. subtilis* sebagai agensia hayati adalah antibiosis (Gambar 1). Hasil pengamatan uji antibiosis *B. subtilis* B315 terhadap *R. solanacearum* menunjukkan zona hambatan terbesar 14 mm (Prihatiningsih & Djatmiko, 2014). Hasil penelitian Kumar *et al.* (2009) menunjukkan bahwa *B. subtilis* MTCC-8114 yang diisolasi dari sampel tanah menunjukkan zona hambatan 14–16 mm dengan metode inokulasi spot.

Zona terang yang terbentuk di sekitar goresan *B. subtilis* B315 pada medium hidrolisis pati ditunjukkan dalam Gambar 2. Menurut Das *et al.* (2011), *B. subtilis* mampu menghasilkan enzim alfa amilase. Dikatakan bahwa bakteri yang menghasilkan enzim amilase tergantung pada tipe strain, komposisi medium, metode kultivasi, pertumbuhan sel, nutrisi yang dibutuhkan, ion logam, pH, suhu, waktu inkubasi, termostabilitas serta terjaga dari kontaminasi selama fermentasi.

Senyawa yang dihasilkan *B. subtilis* B315 dapat terdeteksi setelah kultur *B. subtilis* bebas sel diekstrak dengan etil asetat. Analisis enzim amilase yang dihasilkan *B. subtilis* B315 berdasarkan persamaan regresi dari nilai absorbansi larutan standar glukosa (Gambar 3).

Tabel 1. Penghambatan pertumbuhan *R. solanacearum* oleh *B. subtilis*

Perlakuan <i>B. subtilis</i>	Zona hambatan terhadap <i>R. solanacearum</i> (mm)
B1	5,0 c
B46	12,6 b
B315	14,0 a

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Newman-Keuls 5%.



Gambar 1. Penghambatan *B. subtilis* B315 terhadap *R. solanacearum*



Gambar 2. Zona terang di sekitar koloni *B. subtilis* B315 pada uji hidrolisis pati

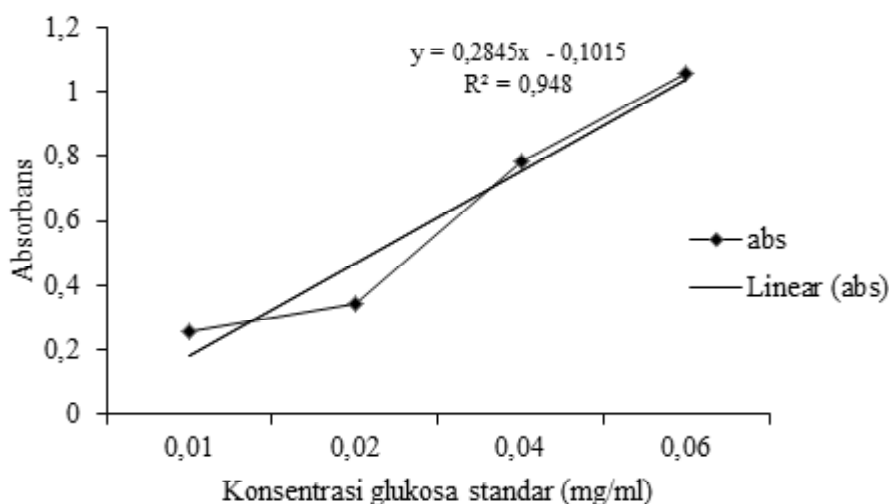
Hasil perhitungan enzim amilase menunjukkan aktivitas sebesar 0,802 unit/ml setiap 30 menit dengan panjang gelombang 275 nm (Tabel 2).

Menurut Barus *et al.* (2013), *Bacillus* sp. menghasilkan amilase dari tape (fermentasi cassava) dengan aktivitas berkisar 4,8–29,1 unit/ml pada suhu 37 °C. *Bacillus* sp. terdistribusi secara luas dan baik digunakan sebagai agens pemacu pertumbuhan tanaman (PGPR), dan umumnya ada di rizosfer. *Bacillus* sp. meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan melenyapkan atau mengendalikan patogen dengan aktivitas antimikrobal yang unik termasuk menghasilkan antibiotik (Awais *et al.*, 2007) dan toksin (Mukry *et al.*, 2010), serta enzim hidrolisis seperti α -amylase dan β -galactosidase yang dapat meningkat pada substrat seperti jagung, gandum, dan beras dibandingkan dengan medium

yang komersial (Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

Enzim ini selain berguna dalam industri ternyata mampu meningkatkan pertahanan tanaman terhadap serangan nematoda, jamur dan bakteri patogen bahkan terhadap insekta. Aktivitas *B. subtilis* antara lain sebagai pelarut fosfat, pengoksidasi elemen sulfur menjadi sulfat, aktivitas selulase dan amilase mampu menghambat jamur *Fusarium oxysporum* 25–34% dan *Botryodiplodia theobromae* 100% (Swain & Ray, 2009). Perhitungan enzim amilase dilakukan dengan terlebih dahulu menentukan persamaan regresi absorbansi glukosa standar (Gambar 3).

Enzim amilase adalah enzim yang dapat diperoleh dari tanaman, binatang maupun mikroba yang berperan dalam metabolisme karbohidrat. Diantara mikroba,



Gambar 3. Regresi absorbansi glukosa standar

Tabel 2. Nilai aktivitas enzim amilase *B. subtilis* B315

Sampel	Nilai absorbans λ 660 nm	X (Nilai aktivitas amilase) dari persamaan regresi ^{a)} (unit/ml)	X (Nilai aktivitas amilase) dari rumus (unit/ml) : 0,18 ^{b)}	X (Nilai aktivitas amilase) ^{c)} : 30 x 2 (unit/ml)
1	0,703	2,8278	11,717	0,781
2	0,720	2,8875	12,048	0,803
3	0,734	2,9367	12,327	0,822
			Rata-rata	0,802

^{a)} Nilai X diperoleh dari persamaan regresi $Y = -0,1015 + 0,2845 X$; ^{b)} Dibagi 0,18 karena satu unit aktivitas enzim amilase didefinisikan sebanyak 0,18 mg gula pereduksi (1 μ mol) yang dibebaskan per ml enzim pada kondisi percobaan; ^{c)} Nilai aktivitas amilase: 30 karena diinkubasi selama 30 menit, dikalikan 2 karena enzim yang dipakai 0,5 ml.

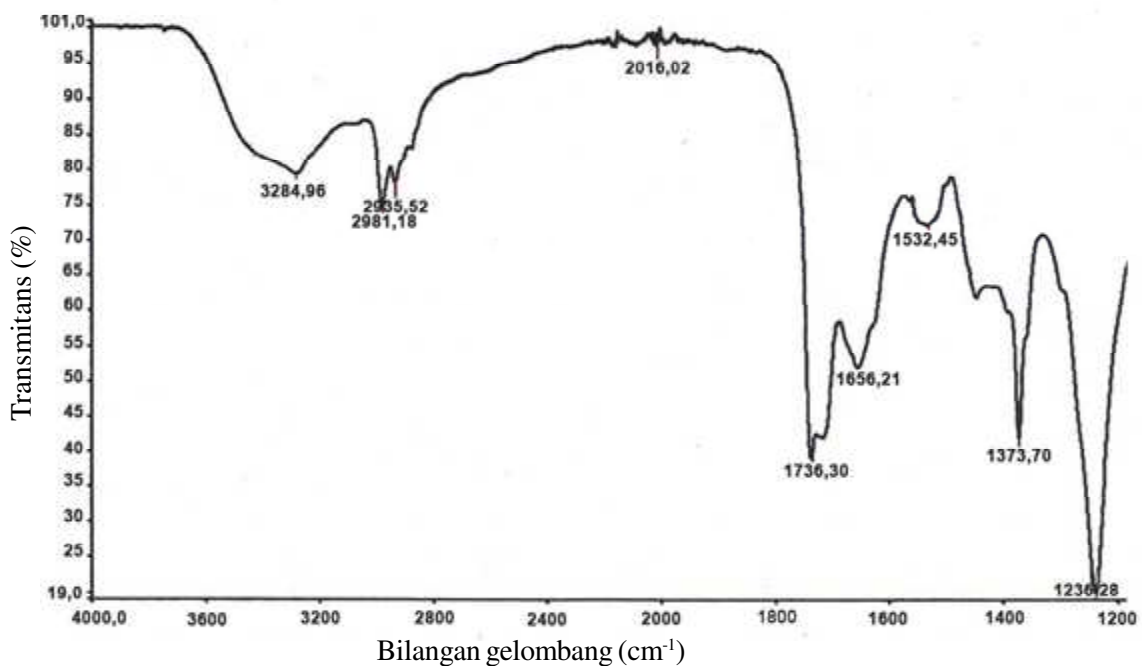
Bacillus sp. digunakan secara luas karena menghasilkan α -amilase dan termostabil (Sankaran & Ravikumar, 2011). Fungsi enzim amilase dalam pengendalian penyakit tanaman adalah sebagai inhibitor, yang melimpah pada sayuran, umbi dan sereal dan secara efisien meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen seperti jamur (Rekha & Padmaja, 2002).

Fungsi enzim dalam pengendalian penyakit tanaman adalah sebagai mekanisme antibiosis yang dapat menghambat dan atau mematikan patogen yang disebut dengan bakteriostatik dan bakterisidal (Goto, 1992). Enzim yang dihasilkan oleh tanaman misalnya enzim α -amilase yang dihasilkan oleh tanaman *Phaseolus vulgaris* dapat berfungsi untuk meningkatkan resistensi terhadap serangan hama penggerek *Callosobruchus maculatus* dan penggerek pada kacang *C. chinensis* (Franco *et al.*, 2002). Selanjutnya dikatakan bahwa tanaman dapat menghasilkan senyawa untuk pertahanan antara lain antibiotik, alkaloid, terpen, glikosida atau proteic seperti chitinase, β -1-3 glukanas,

lektin, arselin, visilin, sistein dan enzim penghambat. Enzim inhibitor (penghambat) dapat merusak sistem pencernaan insekta, cairan pencernaan α -amilase dan proteinase. *B. subtilis* menghasilkan enzim amilase dan selulase, pelarut fosfat, pengoksidasi sulfur, pemacu pertumbuhan tanaman dan pengendali hayati (Swain & Ray, 2009).

Analisis ekstrak *B. subtilis* B315 dengan FTIR menunjukkan bilangan gelombang dan nilai transmitansi dapat dilihat pada Gambar 4, yang menunjukkan nilai daerah bilangan gelombang dengan gugus fungsi yang terbentuk oleh *B. subtilis* B315 dan dimasukkan ke dalam kelompok senyawa yang dihasilkan menurut Skoog *et al.* (1998 dalam Bambang, 2011).

Berdasarkan spektrum FTIR dan hasil analisis gugus fungsi dari *B. subtilis* B315, maka jenis gugus fungsi menurut bilangan gelombang adalah seperti tersaji pada Tabel 3. Gugus fungsi alkana (C-H) pada bilangan gelombang 2981,18 cm^{-1} , gugus fungsi aldehyd, keton, asam karboksilat, dan ester (C=O) pada bilangan



Gambar 4. Spektrum FTIR dari ekstrak *B. subtilis* B315

Tabel 3. Gugus fungsi dan senyawa yang dihasilkan oleh *B. subtilis* B315 berdasarkan bilangan gelombang yang dianalisis dengan FTIR

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Senyawa	Intensitas
2981,18	C-H	Alkana	Kuat
1736,30	C=O	Aldehyd, Keton, Asam Karboksilat, Ester	Kuat
1373,70	C-H	Alkana	Kuat
1235,28	C-O	Amina, Amida	Kuat

gelombang 1736,30 cm^{-1} dan gugus fungsi alkana (C-H) pada bilangan gelombang 1373,70 cm^{-1} , serta gugus fungsi amina, amida (C-N) pada bilangan gelombang 1235,28 cm^{-1} .

SIMPULAN

Berdasarkan uraian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa *B. subtilis* B315 dapat menghambat *R. solanacearum* secara *in vitro* dengan zona hambatan 14 mm. *B. subtilis* B315 menghasilkan enzim amilase sebagai mekanisme antibiosis dengan aktivitas 0,802 unit/ml. *B. subtilis* B315 menghasilkan senyawa kelompok alkana, aldehid, keton, asam karboksilat, ester, amina, dan amida.

SANWACANA

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas dana yang diberikan melalui Hibah Penelitian Desentralisasi pada skim Penelitian Fundamental pada tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiansyah, Ilyas S, Sudarsono, & Machmud M. 2013. Karakterisasi rizobakteri yang berpotensi mengendalikan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan meningkatkan pertumbuhan tanaman padi. *J. HPT Tropika* 13(1): 42–51.
- Awais M, Shah AA, Hameed A, & Hasan F. 2007. Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp. *Pak. J. Bot.* 39(4): 1303–1312.
- Bambang. 2011. *Instrumen FTIR dan membaca spektra FTIR*. (On-line) <http://www.anekakimia.blogspot.com/2011/06>. Diakses tanggal 23 Oktober 2014.
- Barus T, Kristani A, & Yuliandi A. 2013. Diversity of amylase-producing *Bacillus* spp. from “Tape” (fermented cassava). *Hayati J. Biosciences* 20(2): 94–98.
- Champoiseau PG, Jones JB, Momol TM, Pingsheng J, Allen C, Norman DJ, & Caldwell K. 2010. *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 causing brown rot of potato, bacterial wilt of tomato and southern wilt of geranium. American Phytopathological Society. Madison, WI.
- Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Koiter R, Losick R, & Guo J. 2012. *Biocontrol of tomato wilt disease by Bacillus subtilis isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation*. Environmental Microbiology. Society for Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.
- Das S, Singh S, Sharma V, & Soni ML. 2011. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *Int. J. Pharm Bio. Sci.* 1(2): 486–496.
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, & Grossi-de-Sa MF. 2002. Plant α -amylase inhibitor and their interaction with insect α -amylases Structure, function and potential for crop protection. *FEBS J.* 269: 397–412.
- Ghosh S, Sinha A, & Sahu C. 2007. Isolation of putative probiotics from the intestines of Indian mayor carps. *Isr. J. Aquacult.-Bamid.* 59(3): 127–132.
- Goto M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, INC. New York.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65–87.
- Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, & Sharer C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90(11): 1196–1200.
- Konsoula Z & Liakopoulou-Kyriakides M. 2007. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technol.* 98(1): 150–157.
- Kumar A, Saini P, & Shrivastava JN. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian J. Exp. Biol.* 47(1): 57–62.
- Lelliot RA & Stead DE. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant*. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publication, Melbourne.
- Morikawa M. 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J. Biosci. Bioeng.* 101(1): 1–8.

- Mukry SN, Ahmed A, & Khan SA. 2010. Screening and partial characterization of hemolysins from *Bacillus* sp.: strain S128 & S144 are hemolysin B (HBL) producers. *Pak. J. Bot.* 42(1): 463–472.
- Muthoni J, Mbiyu MW, & Nyamongo DO. 2010. A review of potato seed systems and germplasm conservation in Kenya. *J. Agr. Food Information* 11(2): 157–167.
- Prihatiningsih N & Djatmiko HA. 2014. Karakter *Bacillus subtilis* B315 sebagai antibakteri *Ralstonia solanacearum* dan antijamur *Colletotrichum* sp. *Seminar Nasional Pengendalian Penyakit pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan*. Tanggal 20 September 2014. PFI Joglosemar di Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta.
- Rekha MR & Padmaja G. 2002. Alpha-amylase inhibitor changes during processing of sweet potato and taro tubers. *Plant Food Hum. Nutr.* 57: 285–294.
- Sankaran K & Ravikumar S. 2011. Enhanced production and immobilization of alpha amylase using recombinant *Bacillus subtilis* (MTCC 2423). *Int. J. Curr. Res.* 2(1): 176–181.
- Swain MR & Ray RC. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiol. Res.* 164(2): 121–130.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, & Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Dondoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39(11): 897–904.