

UJI AKTIVITAS ANTIBIOSIS PSEUDOMONADS PENDARFLUOR TERHADAP *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki PENYEBAB PENYAKIT AKAR PUTIH

Hasanuddin¹

¹Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara
Jln. Prof. A. Sofyan No.3 Medan 20155. E-mail: hasanuddiny@yahoo.com

ABSTRACT

Antibiosis activity test of fluorescent *Pseudomonads* against *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki the caused agent of white root disease. The potential of fluorescent bacteria as biological control agents for white root disease caused by *Rigidoporus lignosus* has been investigated. Isolation of bacteria from the soil using S1 media produced two fluorescent bacteria isolates. Using the Microbact 12A+12B method, both bacteria were identified as *Pseudomonas fluorescens* and *P. aeruginosa*. These two species of bacteria were then used as antibiosis activity test against *R. lignosus*. Four series antibiosis activity tests were done, that were antibiosis test of media culture bacteria growth to *R. lignosus* colony, antibiosis test of dry fluorescent pigment extract to *R. lignosus*, influence of Fe³⁺ to antibiosis activity of bacteria test, and affinity of media supernatant to Fe³⁺. The results were: antibiosis activity of King's B (KB) media was more effective than media 523 in the inhibition of *R. lignosus* colony growth. There was no significant different antibiosis activity of dry fluorescent pigment extract from media KB and media 523 in the inhibition of *R. lignosus* colony growth. The level of Fe³⁺ in the media might influence antibiosis activity of fluorescent pigment. Affinity test of KB supernatant from fluorescent bacteria culture with Fe³⁺ showed an absorption peak of 410 nm on spectrophotometer, and none for the fungi. These results indicate that *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* produce catechol-type siderophore with high affinity against Fe³⁺ compared with hydroxamate-type siderophore which is generally produced by fungus.

Keywords: Biological control, *Rigidoporus lignosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, antibiosis activity

ABSTRAK

Uji aktivitas antibiosis *Pseudomonads* pendarfluor terhadap *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki penyebab penyakit akar putih. Kajian potensi bakteri pendarfluor sebagai agens hayati pengendalian *Rigidoporus lignosus* penyebab penyakit akar putih telah dilakukan. Isolasi bakteri menggunakan media S1 telah mendapatkan dua isolat bakteri pendarfluor. Dengan metode Microbact 12A + 12B, kedua bakteri teridentifikasi sebagai *Pseudomonas fluorescens* dan *P. aeruginosa*. Kedua jenis bakteri ini selanjutnya digunakan sebagai bakteri uji aktivitas antibiosis terhadap *R. lignosus*. Empat seri uji aktivitas antibiosis dilakukan untuk itu yaitu uji antibiosis media pembiakan bakteri terhadap koloni *R. lignosus*, uji antibiosis ekstrak kering pigmen pendarfluor terhadap koloni *R. lignosus*, pengaruh Fe³⁺ terhadap aktivitas antibiosis bakteri uji, dan afinitas supernatan media terhadap unsur Fe³⁺. Hasil kajian menunjukkan bahwa media King's B (KB) lebih efektif dari pada media 523 dalam menekan pertumbuhan koloni *R. lignosus*. Aktivitas antibiosis dari ekstrak kering media KB dan media 523 berbeda tidak nyata dalam menekan pertumbuhan koloni *R. lignosus*. Kadar Fe³⁺ dalam media dapat mempengaruhi aktivitas antibiosis pigmen pendarfluor. Uji afinitas supernatan media pembiakan *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* terhadap Fe³⁺ menunjukkan bahwa puncak absorbansi spektrofotometer terbaca pada panjang gelombang 410 nm. Hasil ini menunjukkan bahwa *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* menghasilkan siderofor dari golongan katekol yang afinitasnya lebih tinggi dibandingkan siderofor golongan hidraksamat yang umumnya dihasilkan jamur.

Kata kunci : Pengendalian biologi, *Rigidoporus lignosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, aktivitas antibiosis

PENDAHULUAN

Rigidoporus lignosus (Klotzsch) Imazeki adalah jamur saprofit penghuni tanah. Jamur ini dapat bertahan dalam tanah dengan membentuk rizomorf. Jika bertemu dengan akar tanaman akan berubah menjadi parasit dan menyebabkan penyakit akar putih pada beberapa jenis

tanaman. Sekali tanah terkontaminasi oleh *R. lignosus* seterusnya tanah akan dihuni oleh jamur tersebut dan menjadi ancaman untuk setiap penanaman baru. Peremajaan yang berulang-ulang akan menyebabkan akumulasi sumber penyakit akar putih dalam tanah (Basuki, 1985).

Pseudomonas spp, termasuk jenis bakteri aerobik, gram-negatif, beberapa jenis diantaranya mengeluarkan pigmen pendarfluor secara ekstraselluler, satu spesies diantaranya adalah *P. fluorescens*. Bakteri ini dijumpai hampir disemua jenis lahan pertanian dan mempunyai beberapa ciri yang membuatnya sesuai sebagai agen pengendalian hayati penyakit tumbuhan terbawa tanah dan nematode (Weller, 2007). Sehubungan dengan kemampuannya sebagai agen pengendalian hayati, *P. fluorescens* telah dikaji selama beberapa dekade dan sudah diformulasi dan terdaftar sebagai produk komersial di U.S. Environmental Protection Agency sebagai agen pengendalian hayati penyakit tumbuhan (Stockwell & Stack, 2007).

Ciri utama *P. fluorescens* yang membuatnya sesuai sebagai agen pengendalian hayati penyakit tumbuhan yang dapat dikomersilkan antara lain; (i) tumbuh dengan cepat pada sediaan in-vitro untuk produksi misal, (ii) dengan cepat dapat memanfaatkan eksudat akar di persemaian, (iii) dapat membentuk koloni dan penggandaannya di lingkungan rizosfir, spermosfir dan interior tanaman, (iv) menghasilkan pigmen pendarfluor yang menjadi bahan baku bioaktif berspektrum lebar (misalnya, antibiotik, siderofor, senyawa volatil, dan fitohormon), (v) bersaing agresif dengan mikroorganisme lain, (vi) mampu menyesuaikan diri terhadap tekanan lingkungan, dan (vii) memiliki keupayaan genetik yang mendukung kompetensi sebagai agensia hayati (Humphris *et al.*, 2005; Weller, 2007).

Kelompok *Pseudomonas* penghasil pigmen pendarfluor ini disebut sebagai kelompok Pseudomonads pendarfluor. Diantara spesies yang termasuk dalam Pseudomonads pendarfluor adalah *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. ovalis*, *P. mildenbergii*, *P. reptilivora*, *P. geniculata*, dan *P. calciprecipitans* (Meyer & Abdallah, 1978).

P. fluorescens juga berperan sebagai agen *suppressiv* alami terhadap penyakit tumbuhan terbawa tanah pada beberapa lahan, yaitu suatu fenomena berkurangnya kejadian infeksi penyakit tanaman pada lahan yang ditanam tumbuhan sejenis secara terus menerus. Diduga hal ini terjadi karena hasil metabolit bakteri tersebut yang dikeluarkan ke lingkungan akar (Stutz *et al.*, 1986). Kelemahan utama jenis bakteri *P. fluorescens* sebagai agen pengendalian hayati adalah ketidak-mampuan untuk menghasilkan struktur dorman seperti *Bacillus* spp., dan ini mempersulit formulasi bakteri untuk sediaan komersial (Weller *et al.*, 2002).

Pseudomonas spp. mengeluarkan antibiotik 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) yang dapat menekan aneka patogen terbawa tanah, dan dipercayai telah berkontribusi pada beberapa kasus penyakit tanaman

yang gagal berkembang pada jenis tanah tertentu (Weller *et al.*, 2002). Beberapa strain bakteri rizosfir mengeluarkan asam salisilik dalam lingkungan yang khat unsur besi. Asam salisilik ini berkontribusi pada induksi ketahanan tanaman terhadap infeksi penyakit (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Kajian lain menunjukkan bahwa mayoritas bakteri mengeluarkan siderofor, yaitu suatu senyawa bersifat kelat yang berupaya kuat mengikat besi (afinitas terhadap besi) sebagai respon limitasi besi (Barton & Hemming, 1993 dalam Press *et al.*, 2001). Diantara siderofor yang dikeluarkan oleh bakteri rizosfir, hanya pyoverdines (juga disebut pseudobactins) yang dikeluarkan oleh *P. fluorescens* yang berimplikasi terhadap ketahanan terimbas (Duijff *et al.*, 1994).

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antagonis bakteri Pseudomonads pendarfluor terhadap patogen *R. lignosus* melalui uji in-vitro antibiosis pigmen pendarfluor, pengaruh kadar Fe^{3+} media pada aktivitas antibiosis, dan uji afinitas pigmen pendarfluor terhadap unsur Fe^{3+} . Uji in-vitro antibiosis pigmen pendarfluor bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri uji mengeluarkan pigmen pendarfluor yang dapat menghambat pertumbuhan koloni *R. lignosus*. Uji pengaruh kadar Fe^{3+} media dilakukan untuk mengetahui apakah aktivitas antibiosis bakteri pendarfluor terkait dengan pengeluaran siderofor. Uji afinitas pigmen pendarfluor dilakukan untuk mengetahui jenis siderofor yang dihasilkan bakteri pendarfluor dan kemampuannya mengikat unsur Fe^{3+} .

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian USU pada bulan Januari sampai dengan Mei 2009.

Seleksi Bakteri Pendarfluor. Bakteri diisolasi dari tanah hutan konservasi Taman Hutan Raya (TAHURA) di Kabupaten Karo, Sumatera Utara, menggunakan media selektif S1 (Gould *et al.* 1985). Bahan media S1 per liter adalah 18 g agar, 10 g sukrosa, 10 ml gliserol, 5.0 g asam kasamino (Difco), 1.0 g $NaHCO_3$, 1.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.3 g K_2HPO_4 , 1.2 g natrium lauroyl sarkosina, dan 20 mg Trimethoprim (Sigma). Trimethoprim disteril dengan membran filter pori 0.4 m (Advantec MFS) dan dicampur dengan media pada suhu 40-45°C. Media S1 diatur pada pH 7.4-7.6. Media disimpan 2 hari pada suhu kamar sebelum digunakan. Bakteri yang menunjukkan ciri pendarfluor pada media isolasi kemudian dimurnikan. Isolat bakteri pendarfluor selanjutnya diidentifikasi dengan uji karakterisasi

fisiologis dan reaksi biokimia memakai sistem Microbact 12A + 12B ditambah uji oksidase dan motiliti.

Uji Antibiosis Supernatan Media Pemiakan Bakteri terhadap Koloni *R. lignosus*. Uji antibiosis supernatan media pemiakan bakteri dilakukan dengan mengambil supernatan media yang digunakan yaitu media King's B (King *et al.*, 1954 dalam Goszczynska *et al.*, 2007) dan media 523 (Kado dan Heskett, 1970). Bakteri uji dibiakkan dalam 150 ml media dalam erlenmeyer 250 ml. Kandungan media King'B (KB) per liter adalah 20 g proteus pepton, 10 g gliserol, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g $MgSO_4$, media KB diatur pada pH 7,2. Kandungan media 523 per liter adalah 10 g sukrosa, 8 g kasein hidrolisat, 4 g yis ekstrak, 2 g K_2HPO_4 , 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, media 523 diatur pada pH 6,9 setelah disterilkan. Biakan bakteri dikocok dengan pengocok orbital pada kecepatan 150 rpm selama 6 hari pemiakan. Selanjutnya media disentrifugasi menggunakan rotor SS-34 dengan kecepatan 12.000 g (Sorvall RC-5B) selama 10 menit pada suhu 23°C. Supernatan dikumpulkan dan disteril dengan membran filter ukuran pori 0.4 mm dan 0.2 mm (Millipore) secara berurut. Uji antibiosis dilakukan dengan mencampurkan supernatan steril dengan media PDA yang masih cair (suhu 35-40°C) dalam botol universal masing-masing dengan kadar 0 (kontrol), 20, 30, 40, 50 ml per ml PDA. Campuran PDA dan supernatan steril dituang ke dalam cawan petri diameter 9 cm dan dibiarkan dalam suhu kamar selama satu malam. Satu bor gabus (diameter 5 mm) jamur *R. lignosus* dari biakan berumur 8 hari diinokulasikan di tengah media dalam cawan petri. Pengujian dilakukan dengan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan, setiap ulangan terdiri dari 2 cawan petri. Diameter koloni diukur pada hari ke 8 setelah inokulasi.

Ekstraksi Pigmen Pendarfluor. Ekstraksi pigmen pendarfluor dari media pertumbuhan bakteri pendarfluor dilakukan menurut metode Powell *et al.*, (2000) dan Cui & Harling (2006) yang dimodifikasi. Isolat bakteri dibiakkan dalam media KB cair dan media 523 cair untuk mendapatkan ekstrak pigmen pendarfluor. Suspensi biakan bakteri 6 hari setelah inokulasi disentrifugasi dengan rotor SS-34 dengan kecepatan 7.000 g (Sorvall RC-5B) selama 15 menit pada suhu 23°C. Supernatant diambil dan diturunkan pH-nya sampai 2 dengan menambahkan HCL 1 M kemudian ditambah etil asetat dengan perbandingan 1:5 dan larutan dimasukkan dalam corong pemisah dan dikocok 1-2 menit. Lapisan etil asetat yang terpisah dikumpulkan dan dipekatkan dengan evaporator. Ekstrak pigmen pendarfluor dalam labu

evaporator dilarutkan dengan methanol kemudian dikeringkan dalam desikator. Hasil ekstraksi pigmen pendarfluor kering disimpan dalam desikator sebelum digunakan.

Uji Antibiosis Ekstrak Kering Pigmen Pendarfluor terhadap Koloni *R. lignosus*. Uji ekstrak kering pigmen pendarfluor dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibiosis ekstrak kering dari media biakan bakteri yang menampung pigmen pendarfluor yang dihasilkan bakteri. Uji aktivitas antibiosis dilakukan terhadap koloni jamur *R. lignosus*. Sebanyak 100 mg ekstrak kering dilarutkan dalam 1,0 ml aseton 50%. Kadar ekstrak kering pigmen pendarfluor dalam media PDA yang diuji adalah 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, dan 10,0 mg/ml PDA. Untuk perlakuan kontrol positif adalah campuran PDA dengan aseton 50% sesuai dengan volume pelarut yang ditambahkan untuk perlakuan kadar ekstrak kering. Kontrol negatif adalah media PDA yang ditambah 1 ml air suling steril. Media uji di atas dibiarkan selama 3 x 24 jam agar pelarut aseton menguap. Jamur *R. lignosus* dari kultur berumur 8 hari diinokulasikan satu propagul (bor gabus diameter 5 mm) di tengah media dalam cawan petri berdiameter 9 cm. Pengujian dilakukan dengan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 2 cawan petri. Diameter koloni diukur pada hari ke 7 setelah inokulasi.

Pengaruh Fe^{3+} terhadap Aktivitas Antibiosis Bakteri *Pseudomonads* Pendarfluor. Pengujian pengaruh Fe^{3+} terhadap aktivitas antibiosis isolat bakteri dilakukan menurut metode Temple *et al.*, (2004) yang dimodifikasi. Bakteri *Pseudomonads* pendarfluor dikulturkan dalam media KB selama 6 hari. Suspensi biakan bakteri disentrifugasi menggunakan rotor SS-34 dengan kecepatan 12.000 g (Sorvall RC-5B) selama 10 menit pada suhu 23°C. Supernatan dikumpulkan dan disteril dengan membran filter pori 0.4 mm dan 0.2 mm (Millipore). Media PDA sebagai media percobaan ditambah Fe^{3+} steril dengan kadar 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, dan 2500 mg/l PDA, kemudian ditambah dengan supernatant yang telah steril di atas sebanyak 50 ml/ml PDA ($FeCl_3$ dilarutkan dengan air suling dan disterilkan dengan membran filter pori 0.2 mm). Sebagai kontrol media PDA tidak diperlakukan dengan supernatant dan Fe^{3+} . Masing-masing media dengan perlakuan di atas dituang ke dalam cawan petri diameter 9 cm kemudian pada bagian tengah diinokulasi satu propagul miselium *R. lignosus* yang diambil menggunakan bor gabus diameter 5 cm dari kultur jamur berumur 8 hari. Pengujian dilakukan dengan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Tiap-tiap ulangan terdiri

dari 2 cawan petri. Diameter koloni diukur pada hari ke 8 setelah inokulasi.

Affinitas Supernatan Media terhadap Unsur Fe^{3+} .

Affinitas pada unsur Fe^{3+} berarti kemampuan senyawa yang bersifat kelat mengikat Fe^{3+} jika unsur tersebut tersedia dalam jumlah yang terbatas (kawat besi). Pengujian affinitas supernatan media dilakukan menurut metode Scher & Baker (1982), dimana bakteri *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* dan jamur *R. lignosus* masing-masing dibiakkan dalam media KB. Dari kajian ini akan diketahui jenis dan kemampuan siderofor yang dihasilkan bakteri dan jamur patogen sebagai bahan kelat yang mengikat Fe^{3+} . Pengamatan jenis dan kemampuan siderofor tersebut dapat dikenal melalui panjang gelombang puncak absorbansi pada spektrofotometer.

Sebanyak 0,01 ml bakteri dibiakkan dalam 50 ml media dan dikocok di atas pengocok orbital selama 5 hari pada suhu $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Sebanyak 5 propagul (bor gabus diameter 5 mm) *R. lignosus* dibiakkan ke dalam 150 ml media dan dikocok di atas pengocok orbital selama 5 hari. Setelah cukup masa pembiakan bakteri dan jamur, masing-masing suspensi biakan disentrifugasi dengan rotor SS-34 pada kecepatan 2500 g (Sorvall RC-5B) selama 10 menit pada suhu 23°C . Supernatan disterilkan dengan membran filter 0.4 mm (Millipore). Supernatan steril ditetesi dengan 1 M HCl untuk mencapai keasaman pH 5.5. Supernatan steril kemudian dimasukkan kedalam 2 tabung spektrofotometer masing-masing sebanyak 3 ml. Satu tabung ditambah 0.015 ml 10^{-2}M FeCl_3 , sedangkan tabung yang lain sebagai kontrol tidak ditambah FeCl_3 . Uji absorbansi spektrofotometer dibaca mulai dari panjang gelombang 350 nm sampai

500 nm (Bausch Lomb Spectronic 20 spectrophotometer).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Bakteri Pendarfluor. Dua isolat bakteri hasil isolasi yang menunjukkan pigmen pendarfluor hijau-kekuningan pada media S1 dimurnikan dan diperbanyak menggunakan media agar nutrien (Difco). Uji karakterisasi fisiologis dan reaksi biokimia dengan sistem Microbact 12A + 12B ditambah uji oksidase dan motiliti menunjukkan kedua jenis bakteri pendarfluor tersebut adalah *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa*. Spesies bakteri inilah yang digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Antibiosis Supernatan Media Pembiakan Bakteri terhadap Koloni *R. lignosus*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa antibiosis supernatan media KB dari pembiakan *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* lebih kuat menekan pertumbuhan koloni miselium *R. lignosus* dibandingkan antibiosis supernatan dari media 523. Analisis statistik menunjukkan bahwa antibiosis supernatan media KB dari kedua isolat bakteri pada kadar 20 ml/ml lebih kuat menekan pertumbuhan koloni *R. lignosus* daripada supernatan media 523 pada kadar 50 ml/ml. Tabel 1 di bawah ini menunjukkan aktivitas antibiosis supernatan media KB dan media 523 terhadap pertumbuhan koloni *R. lignosus*.

Bakteri *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* termasuk diantara bakteri pengeluar pigmen pendarfluor bersifat antibiosis yang dapat dipanen dari media pembiakannya (Mavrodi *et al.*, 2007). Strains

Tabel 1. Diameter pertumbuhan koloni jamur *R. lignosus* (mm) pada media PDA dengan perlakuan supernatan media pembiakan bakteri *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* dengan tingkat konsentrasi berbeda (8 hari setelah inokulasi)

Asal Supernatan (Jenis bakteri dan media pertumbuhan)	Diameter koloni <i>R. lignosus</i> (mm)			
	Supernatan 20 $\mu\text{l/ml}$	Supernatan 30 $\mu\text{l/ml}$	Supernatan 40 $\mu\text{l/ml}$	Supernatan 50 $\mu\text{l/ml}$
<i>P. fluorescens</i> + Media KB	34,17 b ^(*)	30,17 c	24,83 c	22,17 c
<i>P. fluorescens</i> + Media 523	64,83 a	56,83 b	56,00 b	55,00 b
<i>P. aeruginosa</i> + Media KB	36,83 b	32,83 c	31,17 c	23,83 c
<i>P. aeruginosa</i> + Media 523	65,00 a	59,17 b	55,00 b	53,17 b
Kontrol	68,00 a	68,00 a	68,00 a	68,00 a

Keterangan :

(* = Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji beda nyata Duncan pada taraf 5 %.

Kontrol = Penambahan media PDA dengan air suling steril dengan konsentrasi yang sama dengan penambahan konsentrasi supernatan.

Pseudomonas spp. pendarflour secara ekstensif telah dikaji sebagai agen pengendalian hayati dan kesemuanya mengeluarkan senyawa antibiotik larut air seperti turunan fenazin, pyoluteorin, pyrrolnitrin, oomycin A, viscosinamide, dan 2,4-diacetylphloroglucinol (Michel *et al.*, 2005). 2,4-DAPG keluaran strain *Pseudomonas fluorescens* aktif melawan bakteri fitopatogenik, jamur, oomycetes, dan nematode. Hasil purifikasi 2,4-DAPG dapat berfungsi sebagai antiviral, antibakterial, antijamur, dan memperkaya fitotoksik (Haas dan Défago, 2005). Cara kerja dari 2,4-DAPG melawan fitopatogen belum dapat dijelaskan sepenuhnya, tetapi terhadap *Pythium* spp. diduga telah menyebabkan kerusakan pada membran sel dan zoospora (de Souza *et al.*, 2003).

Antibiosis Ekstrak Kering Pigmen Pendarflour terhadap Koloni *R. lignosus*. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ekstrak kering pigmen pendarflour dari kedua jenis bakteri dan kedua jenis media pembiakan bakteri berbeda nyata dibandingkan kontrol. Aktivitas antibiosis ekstrak kering terhadap koloni *R. Lignosus* sudah menunjukkan efektifitasnya dari kadar yang paling rendah pada pengujian ini yaitu 0,5 mg/ml. Analisis statistik pengaruh perlakuan ekstrak kering pigmen

endarflour dari bakteri *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* disajikan dalam Tabel 2.

Meskipun antibiosis ekstrak kering pigmen pendarflour masing-masing bakteri dari media 523 dan media KB pada kadar yang sama berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan aktivitas berbeda tidak nyata, namun dalam penelitian ini untuk memperoleh ekstrak kering diperlukan volume media 523 yang lebih banyak daripada media KB, ini menunjukkan bahwa penggunaan media KB sebagai penghasil pigmen pendarflour yang bersifat antibiosis terhadap *R. Lignosus* lebih efektif dibandingkan medium 523.

Pengaruh Fe^{3+} terhadap Aktivitas Antibiosis *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa supernatan dari kedua jenis bakteri akan berkurang aktivitas antibiosisnya terhadap jamur bila unsur Fe^{3+} mencapai kadar tertentu dalam PDA. Semakin kecil kadar Fe^{3+} dalam media PDA (100 sampai dengan 0 g/l), aktivitas antibiosis supernatan media pembiakan bakteri semakin kuat menekan pertumbuhan koloni *R. lignosus*. Pada kadar Fe^{3+} 250 sampai dengan 1.000 mg/l PDA aktivitas antibiosis mencapai optimum. Pada kadar Fe^{3+} 2.500 mg/l aktivitas antibiosis menurun,

Tabel 2. Pengaruh perlakuan ekstrak kering pigmen pendarflour dari bakteri *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* terhadap pertumbuhan koloni *R. lignosus* pada media PDA 7 hari setelah inokulasi

Kadar ekstrak kering dari media KB dan 523 (μ g/ml PDA)	Diameter koloni (mm) ^a	
	Asal ekstrak biakan bakteri	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Media 523		
0,5	64,00 b ^{*)}	59,67 b
1,0	56,00 c	54,67 bc
2,5	48,00 de	43,00 d
5,0	42,33 fg	35,00 ef
7,5	38,67 gh	30,67 f
10,0	36,67 h	30,33 f
Media KB		
0,5	56,33 c	53,67 c
1,0	51,33 cd	50,67 c
2,5	45,33 ef	38,00 de
5,0	39,67 gh	35,00 ef
7,5	39,33 gh	31,83 ef
10,0	36,00 h	29,17 f
Kontrol +	71.67 a	71.67 a
Kontrol -	67.00 ab	67.0 ab

a) Rerata dari 3 ulangan,

*) huruf yang sama pada kolom yang sama berarti perlakuan berbeda tidak nyata berdasarkan uji jarak ganda Duncan's pada taraf 5%.

diduga ini terjadi karena kadar Fe^{3+} telah melewati batas normal sehingga menghambat pertumbuhan koloni jamur. Hasil analisis statistik pengaruh Fe^{3+} terhadap aktivitas antibiosis *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* disajikan dalam Tabel 3.

puncak absorbansi dari supernatan media pertumbuhan *R. lignosus* (Gambar 1).

Menurut Teintze *et al.*, (1981) dan Scher & Baker (1982) jika puncak absorbansi terbaca pada panjang gelombang 410 nm menunjukkan bahwa

Tabel 3. Pengaruh kadar Fe^{3+} dalam PDA terhadap aktivitas antibiosis supernatan media KB dari pengkulturan *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa*

Kadar Fe^{3+} dalam PDA ($\mu\text{g/l}$)	Diameter koloni <i>R. lignosus</i> (mm) ^a	
	Asal supernatant	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	22,33 e	22,66 g
10	22,33 e	30,00 f
25	23,83 e	32,17 ef
50	36,17 cd	34,17 e
100	40,00 bc	39,33 d
250	45,33 b	45,17 c
500	44,83 b	48,33 bc
1.000	42,83 b	49,17 b
2.500	32,17 d	32,33 ef
Kontrol ^b	68,33 a	68,33 a

Keterangan :

- Huruf yang sama pada kolom yang sama berarti perlakuan berbeda tidak nyata berdasarkan uji jarak ganda Duncan's pada taraf 5%.
- Media PDA tanpa penambahan Fe^{3+} dan supernatan media biakan bakteri.

Di bawah kondisi kahat besi, mikroba menghasilkan bahan kelat yang disebut siderofor yang dapat mengikat unsur besi dan sesudah itu mengangkutnya ke dalam sel mikroba (Jean-Marie *et al.*, 2002). Pada kondisi kahat besi tersebut *P. fluorescens* WCS374 menghasilkan siderofor pseudobactin pendarfluor, asam salisil, dan pseudomonine yaitu sejenis siderofor yang mengandung sebagian asam salisil. Sedangkan *P. aeruginosa* mengeluarkan pyochelin, yaitu siderofor yang dapat mengikat Mo^{4+} , Co^{2+} , dan Fe^{3+} (Sebat *et al.*, 2001). Hasil kajian menunjukkan bahwa antibiosis supernatan media pembiakan bakteri uji terhadap pertumbuhan koloni jamur *R. lignosus* dipengaruhi oleh kadar besi, ini menunjukkan bahwa supernatan media pembiakan bakteri merupakan bahan kelat yang mekanisme kerjanya dipengaruhi kesediaan unsur besi.

Affinitas Supernatan Media terhadap Unsur Fe^{3+} . Hasil pengujian affinitas terhadap unsur Fe^{3+} dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa puncak absorbansi pigmen pendarfluor dari supernatan media pembiakan *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* terbaca pada panjang gelombang 410 nm, dan tidak ditemukan

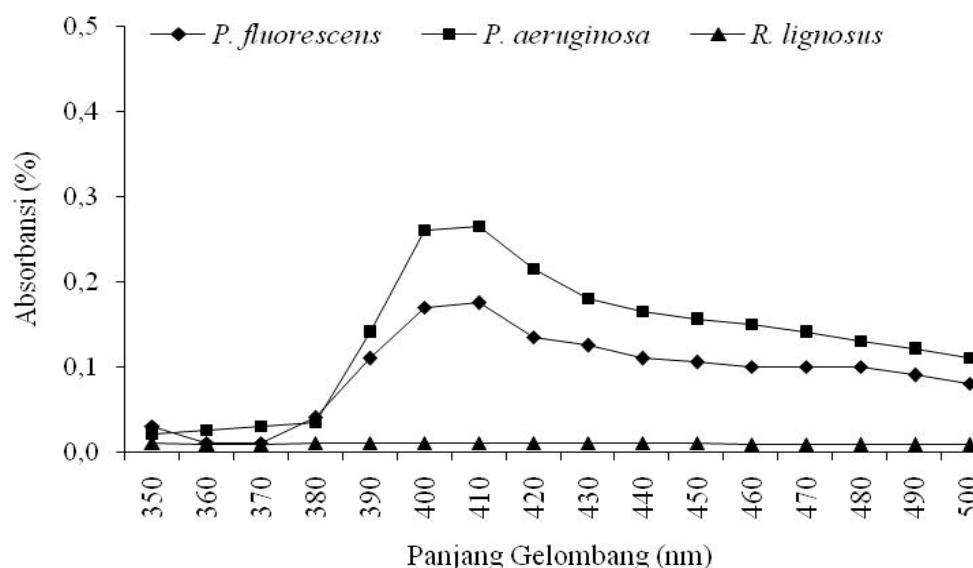
siderofor yang dihasilkan dari golongan katekol. Menurut Neilands & Leong (1986) siderofor dari golongan katekol lebih kuat affinitasnya terhadap unsur besi dari pada siderofor golongan hidroksamat yaitu siderofor yang umumnya dihasilkan oleh jamur. Hasil kajian ini menunjukkan bahwa kompetisi terhadap unsur Fe^{3+} menjadi salah satu mekanisme antibiosis *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* terhadap jamur *R. lignosus*.

SIMPULAN

Dua isolat bakteri dalam penelitian ini yaitu *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* merupakan jenis bakteri dari kelompok Pseudomonads pendarfluor yang menghasilkan pigmen pendarfluor yang bersifat antibiosis terhadap *R. lignosus*. Aktivitas antibiosis pigmen pendarfluor dipengaruhi oleh kadar Fe^{3+} , ini menunjukkan bahwa antibiosis isolat bakteri uji terkait dengan pengeluaran siderofor sebagai bahan kelat yang dapat mengikat unsur Fe^{3+} . Uji affinitas pada spektrofotometer memperlihatkan bahwa siderofor yang dihasilkan *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* termasuk siderofor golongan katekol yang lebih kuat mengikat unsur Fe^{3+} dibandingkan siderofor golongan hidroksamat yang

umumnya dihasilkan jamur. Dengan demikian kompetisi terhadap unsur Fe^{3+} merupakan mekanisme antagonis

P. fluorescens dan *P. aeruginosa* terhadap *R. lignosus*.



Gambar 1. Puncak absorbansi pigmen pendarflour dari supernatan media biakan bakteri *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* dan jamur *R. lignosus* pada Spektrofotometer 350-500 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- Basuki. 1985. Efforts in the control of WRD (R.I) of rubber in Indonesia. Pp: 209-221 In: Rubber Research Institute of Malaysia, Proceedings International Rubber Conference, Kuala Lumpur Malaysia, October, 21-25, 1985.
- Cui X & Harling R, 2006. Evaluation of bacterial antagonists for biological control of broccoli head rot caused by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 96(5): 408-416.
- de Souza JT, Arnould C, Deulvot C, Lemanceau P, Gianinazzi-Pearson V & Raaijmakers JM. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: Cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93(8): 966-975.
- Duijff BJ, Bakker PAHM & Schipper B. 1994. Suppression of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Sci. Technol.* 4(3): 279-288.
- Goszczynska T, Botha WJ, Venter SN & Coutinho TA. 2007. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. *Plant Dis.* 91(6): 711-718.
- Gould WD, Hagedorn C, Bardinelli TR & Zablotowicz RM. 1985. New selective media for enumeration and recovery of Fluorescent *Pseudomonads* from various habitat. *Appl. And Environ. Microbiol.* 49(1): 28-32.
- Haas D & Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4): 307-319.
- Humphris SN, Bengough AG, Griffiths BS, Kilham K, Rodger S, Stubbs V, Valentine TA & Young IM. 2005. Root cap influences root colonisation by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54(1): 123-130.
- Jean-Marie Meyer, Valérie AG, Nader B, Louis G, Daniel I, Philippe L, Wafa A & Norberto JP. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Appl. And Environ. Microbiol.* 68(6): 2745-2753.
- Kado CI & Heskett MG. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*,

- Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, and Xanthomonas. *Phytopathology*. 60(6): 969-976.
- Kloepper JW. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pp. 255–274 In: Metting FB, ed. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Loper JE, Kobayashi DY & Paulsen IT. 2007. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. *Phytopathology*. 97(2): 233–238.
- Mavrodi DV, Ian TP, Qinghu Ren & Joyce EL. 2007. Genomics of *Pseudomonas Fluorescens* PF-5. Pp. 3-30 In: Juan-L. R. & Alain F. eds. *Pseudomonas “A Model System in Biology”*. Springer, NY
- Meyer JM & Abdallah MA. 1978. The fluorescent pigmen of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107(2): 319-328.
- Michel L, Gonzalez N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T & Reimmann C. 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol. Microbiol.* 58(2): 495–509.
- Neilands JB & Leong SA, 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 37(6): 187-208.
- Powell JF, Vargas JM Jr, Nair MG, Detweiler AR & Chandra A. 2000. Management of dollar spot on creeping bentgrass with metabolites of *Pseudomonas aureofaciens* (TX-1). *Plant Dis.* 84(1): 19-24.
- Press CM, Loper JE & Kloepper JW. 2001. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology*. 91(6): 593-598.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I & de Kock MJ. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19(7): 699–710.
- Scher FM & Baker R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on indction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*. 72(12): 1567-1573.
- Sebat JL, Paszczynski AJ, Cortese MS & Crawford RL. 2001. Antimicrobial properties of pyridine-2,6-dithiocarboxylic acid, a metal chelator produced by *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 67(9): 3934–3942.
- Stockwell VO & Stack JP. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*. 97(2): 244-249.
- Stutz EW, Defago G & Kern H. 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*. 76(2): 181–185
- Teintze M, Hossain MB, Baines CL, Leong J & van der Helm D. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* 20(22): 6446-6457.
- Temple TN, Stockwell VO, Loper JE & Johnson KB. 2004. Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* A506 on flowers of pear and apple. *Phytopathology*. 94(12): 1286-1294.
- Weller DM. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*. 97(2): 250-256.
- Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB & Thomashow LS. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40(1):309-348.