

Kompatibilitas *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Trichoderma harzianum* untuk Mengendalikan *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Kentang

Hanudin¹⁾, Marwoto, B¹⁾, Hersanti²⁾, dan Muharam, A³⁾

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang - Pacet, Cianjur 43253

²⁾ Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Jatinangor, Sumedang 40600

³⁾ Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 10, Bogor 16114

Naskah diterima tanggal 11 April 2011 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 10 Januari 2012

ABSTRAK. Dalam usaha budidaya kentang dijumpai berbagai kendala yang menekan produktivitas tanaman. Salah satu kendala yang paling penting yaitu patogen tular-tanah yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith. Hasil pengamatan di lapangan menunjukkan bahwa patogen ini dapat menimbulkan kehilangan hasil tanaman kentang 40–100%. Salah satu alternatif yang paling prospektif dalam mengendalikan *R. solanacearum* ialah dengan mengaplikasikan mikroba antagonis yang diisolasi dari alam. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Trichoderma harzianum* merupakan mikroba antagonis yang mampu mengendalikan patogen yang terbawa tanah sampai 70% dan mampu meningkatkan produksi tanaman sampai 40%. Penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi kompatibilitas mikroba antagonis dan dapat mengendalikan *R. solanacearum* pada tanaman kentang. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitopatologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Sayuran, dan Laboratorium Bakteriologi Balai Penelitian Tanaman Hias, pada bulan Maret sampai dengan Desember 2009. Dari hasil penelitian ini diperoleh dua nomor isolat bakteri yaitu *P. fluorescens* yang diisolasi dari rizosfer krisan, Segunung (Pf2), *B. subtilis* berasal dari IPB (Bs 12), dan satu isolat *T. harzianum* berasal dari Universitas Gadjah Mada (Th 1) kompatibel pada media yang banyak mengandung protein (King's B), tetapi tidak kompatibel pada media yang banyak mengandung karbohidrat (*potato dextrose agar*). Indikatornya ialah indeks kompatibilitas ≤ 1 . Aplikasi *B. subtilis* secara tunggal merupakan perlakuan yang paling efektif mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang. Hal tersebut ditunjukkan oleh persentase penekanan perlakuan tersebut paling besar (35,27%) bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya, kecuali perlakuan gabungan antara Bs 12, Pf 2, dan Th 1 yang sama-sama menunjukkan persentase penekanan sebesar 35,27%.

Katakunci: *Solanum tuberosum*; Kompatibilitas; *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; *Trichoderma harzianum*; Pengendalian; *Ralstonia solanacearum*; Layu bakteri

ABSTRACT. Hanudin, Marwoto, B, Hersanti, and Muharam, A 2012. **Compatibilities of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Trichoderma harzianum* to Control *Ralstonia solanacearum* on Potato.** Among the vegetable crops cultivated by farmers, potato is the most important one. In cultivating the crop, farmers has faced many problems, the most important one is wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith. Based on the available data known that the disease reduces 40–100% of the total production. One of the alternative methods control which was more environmentally friendly applied by the use of antagonistic microbes isolated from the soil. *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens*, and *T. harzianum* were abundance in the soil and easily be isolated from rhizosfer. The bacteria are reported to be effective to control soilborn pathogens in the field. Based on the preliminary research proven that the bacteria could reduce 70% of the total soilborn pathogens in the soil and increase crop production up to 40%. The objective of this study was to determine information of compatibilities between antagonistic microbe and bacterial wilt which had control on potato. The research were conducted in Laboratory and Greenhouse of the Padjadjaran University, Indonesian Vegetable Research Institute, and Indonesian Ornamental Crops Research Institute, on March to December 2009. The results showed that isolates of *P. fluorescens* (Pf2), *B. subtilis* (Bs12), and *T. harzianum* (Th1) were compatible on medium which containing protein (King's B), but were not compatible on medium containing carbohydrate (PDA). The indicator is compatibility index ≤ 1 . Single application of *B. subtilis* was effective to control *R. solanacearum* on potato, suppression wilt biggest (35,27%), if compared with other treatments except combination between Bs 12, Pf 2, and Th 1 treatments was 35,27 % too.

Keywords: *Solanum tuberosum*; Compatibilities; *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; *Trichoderma harzianum*; Control; *Ralstonia solanacearum*; Bacterial wilt

Dalam usaha budidaya kentang dijumpai berbagai kendala yang dapat menghambat produktivitasnya. Salah satu kendala yang penting ialah patogen tular-tanah yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith. Serangan bakteri ini menyebabkan tanaman layu yang diikuti oleh pembusukan umbi. Hasil pengamatan di lapangan menunjukkan bahwa patogen ini dapat menyebabkan kehilangan hasil tanaman kentang 40–100% (Hanudin 1997, Skoglund *et al.* 1994, Gunawan 1987a, 1987b).

Hal ini sangat merugikan petani, mengingat investasi untuk biaya produksi kentang tergolong tinggi. Berbagai upaya pengendalian telah dilakukan, salah satu yang paling banyak digunakan ialah penggunaan bakterisida sintetik. Penggunaan pestisida sintetik pada budidaya tanaman sayuran tergolong tinggi terutama pada budidaya kentang secara konvensional. Bahkan beberapa laporan menyebutkan bahwa residu Kimia sintetik mencapai ambang yang mengkhawatirkan. Kondisi demikian tidak dapat dipertahankan lagi.



mengingat pemberlakuan ISO 14000 dalam era globalisasi tentang jaminan kesehatan selama proses produksi. Oleh karena itu perlu dicari alternatif lain untuk mengendalikan patogen tanaman kentang tanpa memperparah masalah lingkungan. Salah satu alternatif yang paling prospektif yaitu dengan mengaplikasikan mikroba antagonis yang diisolasi dari alam.

Bacillus subtilis dan *Pseudomonas fluorescens* merupakan mikroba antagonis yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai agens pengendali patogen pada tanaman kentang. Kedua mikroba tersebut diformulasi oleh Hanudin et al. (2009) dalam bentuk biopestisida cair yang diberi nama dagang Prima BAPF. Biopestisida tersebut juga dievaluasi kemangkusannya dan dipatenkan di Kementerian Hukum dan Hak Azasi Manusia Republik Indonesia melalui Direktorat Jenderal Hak Kekayaan Intelektual (Dirjen Haki) dengan nomor sertifikat paten ID. 0 022 384, 12 Januari 2009.

Hasil pengujian skala laboratorium, rumah kaca, dan lapangan menunjukkan bahwa aplikasi *Bacillus* sp. dan *P. fluorescens* dalam formulasi emulsi dapat mengendalikan *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir hingga mencapai 63,63% (Hanudin 2004a), mengendalikan penyakit layu bakteri (*R. solanacearum*) pada tomat, serta penyakit akar bengkak (*Plasmodiophora brassicae*) pada caisim (Hanudin & Marwoto 2003). Selain itu *Trichoderma* spp. yang diformulasikan dalam bentuk tepung efektif mengendalikan penyakit layu *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir (Nuryani et al. 2003), penyakit busuk daun (*Phytophthora infestans*) pada kentang (Haryadi 2001), serta penyakit rebah kecambah yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* (Hanudin et al. 2004b).

Biopestisida cair hasil formulasi Hanudin et al. (2009) dengan bahan pembawa parafin hidrokarbon (semi organik) yang apabila dicampur dengan air

untuk diaplikasikan, maka campuran tersebut tampak berbusa. Hal ini menimbulkan keraguan bagi petani yang bergerak dalam bidang pertanian organik yang sama sekali tidak menggunakan bahan kimia sintetis untuk membudidayakan tanamannya. Oleh karena itu, formulasi biopestisida tersebut harus disempurnakan. Penyempurnaan formulasi biopestisida dilakukan menggunakan gabungan metode Hanudin et al. (2004a) dan Nuryani et al. (2003). Apabila *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* setelah diuji bersifat kompatibel satu sama lain, maka penelitian selanjutnya pada ketiga mikroba antagonis tersebut digabungkan dalam satu formulasi bentuk tepung, sehingga pada penelitian ini, diuji terlebih dahulu kompatibilitas antarisolat mikroba antagonis dan keefektifannya terhadap penyakit layu bakteri.

Tujuan penelitian ialah mendapatkan informasi kompatibilitas antartiga isolat mikroba antagonis dan yang dapat mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang. Hipotesis yang diajukan pada percobaan ini ialah *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* diduga kompatibel satu dengan lainnya dan ketiganya secara sinergis dapat mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian uji *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi, Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung dan Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, sedangkan uji *in vivo* dilaksanakan di Rumah Kaca bagian Penyakit Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Lembang (1.250 m dpl.), mulai Maret sampai dengan Desember 2009.

Kultur Bakteri Patogen dan Mikroba Antagonis

Isolat *R. solanacearum* diperoleh dari tanaman tomat yang berasal dari Kebun Percobaan Fakultas

Tabel 1. Jumlah perlakuan dalam uji kompatibilitas *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* secara *in vitro* (Number of treatments on compatibilities *in vitro* test of *B. subtilis*, *P. fluorescens*, and *T. harzianum*)

Perlakuan jenis media (<i>Kinds of media</i>)		Keterangan (<i>Remarks</i>)
King's B	PDA	
<i>B. subtilis</i> (Bs)	<i>B. subtilis</i> (Bs)	Satu perlakuan ditempatkan pada satu cawan petri. Setiap perlakuan diulang empat kali.
<i>P. fluorescens</i> (Pf)	<i>P. fluorescens</i> (Pf)	
<i>T. harzianum</i> (Th)	<i>T. harzianum</i> (Th)	
Bs x Pf	Bs x Pf	
Bs x Th	Bs x Th	
Pf x Th	Pf x Th	
Bs x Pf x Th	Bs x Pf x Th	



Pertanian, Universitas Padjadjaran. Contoh tanaman yang diduga terinfeksi bakteri layu dicabut bersama dengan akarnya, kemudian bagian akar dan batang dicuci untuk membersihkan tanah yang masih menempel. Selanjutnya batang bagian bawah dipotong miring menggunakan silet, lalu dimasukkan ke dalam *test tube* yang berisi air steril. Dari akar yang telah dipotong, setelah 5 menit kemudian keluar massa bakteri berupa cairan berwarna putih susu membentuk suspensi. Suspensi massa bakteri digoreskan secara aseptis pada media yang mengandung tetrazolium klorida (TZC). Komposisi dalam 1 l media tersebut ialah 5 g glukose, 10 g pepton, 1 g *casamino acid*, 15 g *bacto difco*, dan 1 ml larutan 1% (w/v) 2,3,5 trifenil tetrazolium klorida. Tipe koloni *R. solanacearum* yang virulen tampak berwarna merah muda dan fluidal diseleksi, kemudian dimurnikan dan disimpan dalam air steril untuk digunakan pada pengujian selanjutnya.

Mikrob antagonis diperoleh dari hasil penelitian Hersanti *et al.* (2009) yang terbukti efektif mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang. Isolat-isolat tersebut ialah *B. subtilis* (Bs12) dan *P. fluorescens* (Pf 2). *Bacillus subtilis* atau *P. fluorescens*, masing-masing dibiakkan pada media nutrisi agar (NA) atau King's B, selanjutnya diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 29–31°C selama 24 jam. Isolat lainnya ialah *T. harzianum*, yang dibiakkan pada media *potato dextrose agar* (PDA), dan diinkubasikan pada kondisi suhu ruangan (25–29°C) selama 1 minggu. Kemudian masing-masing isolat dipilih berdasarkan bentuk dan warna koloni.

Bentuk dan warna koloni *B. subtilis* pada media NA bentuknya bulat besar dengan permukaan rata, kasar, dan berwarna krem. Bentuk dan warna koloni *P. fluorescens* pada media King's B ialah bulat besar dengan permukaan rata, halus, dan berwarna hijau. Apabila koloni tersebut disinari ultra violet (UV), maka koloni tampak berwarna hijau berpendar (*fluorescens*).

Bentuk dan warna koloni *T. harzianum* secara visual berupa kumpulan miselium berwarna hijau lumut. Setelah mendapatkan mikrob antagonis yang murni, kemudian dilanjutkan dengan pengujian kompatibilitas secara *in vitro* dan *in vivo*.

Uji Kompatibilitas Secara *In Vitro*

Media NA, King's B, atau PDA masing-masing sebanyak 75 ml dicairkan dengan cara dipanaskan. Setelah suhu diperkirakan mencapai $\pm 45^\circ\text{C}$, sebanyak 15 ml/petri media tadi dituangkan ke dalam setiap cawan petri. Setelah itu didiamkan selama 10 menit hingga membeku. Setelah media membeku, dimasukkan kertas saring steril berdiameter 0,8 cm (yang sebelumnya direndam dalam suspensi mikrob antagonis sesuai perlakuan pada kerapatan 10^7 cfu/ml) dimasukkan ke dalam media tersebut, lalu diinkubasikan dalam inkubator pada suhu $30 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 48 jam.

Rancangan yang digunakan ialah acak lengkap, terdiri atas tujuh kombinasi perlakuan dengan empat ulangan (Tabel 1).

Pengamatan dilakukan setiap hari, dimulai 1 hari setelah investasi (HSI) sampai dengan berumur 15 HSI atau sampai mikrob antagonis menunjukkan reaksi. Adapun parameter yang diamati ialah luas areal pertumbuhan bakteri dan cendawan antagonis (cm^2) serta reaksi antarmikrob antagonis. Kompatibilitas mikrob antagonis ditentukan berdasarkan indeks kompatibilitas (IK) dengan rumus yang diadopsi dan dimodifikasi dari Hamilton & Attia (1997):

$$IK = \frac{\text{Pertumbuhan MA tunggal}}{\text{Pertumbuhan MA gabungan}}$$

di mana :

IK ≤ 1 = Campuran mikrob antagonis tersebut kompatibel;

IK > 1 = Campuran mikrob antagonis tersebut tidak kompatibel.

Tabel 2. Jumlah perlakuan dalam uji kompatibilitas *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* secara *in vivo* (Number of treatments on compatibilities *in vivo* test of *B. subtilis*, *P. fluorescens*, and *T. harzianum*)

Perlakuan (Treatments)	Keterangan (Remarks)
<i>B. subtilis</i> (Bs)	Setiap mikrob antagonis diaplikasikan ke dalam media pertumbuhan tanaman dalam polibag dengan kerapatan 10^7 cfu/ml. Setiap perlakuan terdiri atas lima polibag, dan setiap polibag berisi dua umbi bibit, sehingga total umbi bibit yang digunakan yaitu 270 knol.
<i>P. fluorescens</i> (Pf)	
<i>T. harzianum</i> (Th)	
<i>B. subtilis</i> x <i>P. fluorescens</i>	
<i>B. subtilis</i> x <i>T. harzianum</i>	
<i>P. fluorescens</i> x <i>T. harzianum</i>	
<i>B. subtilis</i> x <i>P. fluorescens</i> x <i>T. harzianum</i>	
Streptomisin sulfat 20%, 2 g/l (Bakterisida sintetik)	
Kontrol (air steril)	



Uji Kompatibilitas Secara *In Vivo*

Varietas kentang yang digunakan ialah Granola generasi ke nol (G_0) yang rentan terhadap *R. solanacearum*, diperoleh dari penangkar benih kentang di Lembang. Benih kentang berukuran sekitar 10 g ditanam pada polibag berdiameter 30 cm, yang berisi media campuran tanah dan pupuk kandang 1:1 v/v yang dipasteurisasi menggunakan uap panas pada suhu 70–80°C selama 5 jam. Media tanam tersebut sebelumnya diinokulasi *R. solanacearum* dengan kerapatan 10^9 cfu/ml berdasarkan metode Hanudin (1997). Biakan *R. solanacearum* ditumbuhkan pada media *tetrazolium chloride* (TZC), kemudian pada umur 2 HSI patogen dipanen. Satu cawan petri yang berisi biakan *R. solanacearum* disuspensikan ke dalam air steril kerapatan 10^9 cfu/ml, kemudian diinfestasikan ke dalam media campuran pupuk kandang : tanah (1:1 v/v) yang telah dipasteurisasi.

Aplikasi *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* dilakukan pada saat tanam, kemudian diikuti dengan interval 7 hari setelah aplikasi (HSA) pertama sampai tanaman berumur 50 hari setelah tanam (HST) atau inisiasi umbi. Metode aplikasi dengan cara perendaman umbi dalam suspensi *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* selama 10 menit kemudian suspensi mikroba antagonis sisa perendaman disiramkan pada media tanam (75 ml/polibag). Konsentrasi inokulum yang digunakan ialah 10^7 cfu/ml. Populasi tanaman yang digunakan ialah 10 tanaman/perlakuan, sehingga total yang diperlukan ialah (10 tanaman x 9 perlakuan x 3 ulangan = 270 tanaman). Rancangan yang digunakan ialah acak kelompok, terdiri atas sembilan perlakuan dengan tiga ulangan (Tabel 2).

Parameter yang diamati ialah waktu inkubasi dan jumlah tanaman layu. Pengamatan waktu inkubasi dilakukan dengan mengamati timbulnya gejala layu pada tanaman kentang yang diamati setiap hari sampai tanaman berumur 70 HST, sedangkan data jumlah tanaman layu diperoleh dari hasil pengamatan waktu inkubasi yang direkap setiap minggu sekali. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan ANOVA menggunakan SPSS 15. Untuk mengetahui perbedaan di antara perlakuan, maka dilakukan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5%.

Kolonisasi Mikrob Antagonis pada Akar, Persentase Penekanan, dan AUDPC Jumlah Tanaman Layu

Kolonisasi mikrob antagonis pada akar atau tanah di sekitar rizosfer tanaman kentang, diamati pada saat panen (umur 85 HST) dengan mengadopsi metode Hsu *et al.* (1994). Pengujian ini dilaksanakan dalam tiga seri percobaan. Pada percobaan seri pertama menempatkan

B. subtilis secara tunggal yang digabungkan dengan *P. fluorescens* dan atau *T. harzianum*, sedangkan pada percobaan seri kedua dan ketiga, masing-masing menempatkan *P. fluorescens* dan *T. harzianum* secara tunggal yang digabungkan dengan *B. subtilis* dan atau *T. harzianum*.

Akar tanaman sepanjang 2 cm atau 1 g tanah di sekitar rizosfer dimasukkan ke dalam 9 ml air steril kemudian dilakukan pengenceran berseri dan dibiakkan di atas media King's B (untuk *B. subtilis* dan *P. fluorescens*) dan PDA (untuk *T. harzianum*) selama 48 jam dalam inkubator suhu 30°C. Kemudian populasi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dihitung menggunakan *colony counter* SUNTEX nomor model CC-560, nomor seri 9308 01828, sedangkan spora *T. harzianum* dihitung menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40 x.

Selain parameter pengamatan tersebut, dihitung juga persentase penekanan dibanding kontrol, dan luas areal di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC). Persentase penekanan dan AUDPC mencerminkan kriteria efikasi. Apabila persentase penekanan semakin tinggi yang diikuti dengan nilai AUDPC yang semakin rendah, maka perlakuan tersebut semakin efektif mengendalikan patogen dan sebaliknya. Persentase penekanan dihitung berdasarkan rumus:

$$PP = (K-T/K) \times 100\%$$

di mana:

PP = Persentase penekanan;

K = Kontrol;

T = Perlakuan.

Sedangkan AUDPC dihitung menggunakan integrasi trapezoidal dengan rumus Jeger & Viljanen-Rollinson (2001) yaitu :

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left| \frac{(Y_{i+1} + Y_i)}{2} \right| t_{i+1} - t_i$$

di mana :

Y_{i+1} = Data pengamatan ke $i + 1$;

Y_i = Data pengamatan ke i ;

t_{i+1} = Waktu pengamatan ke $i + 1$;

t_i = Waktu pengamatan ke- i ;

n = Jumlah total pengamatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kompatibilitas Secara *In Vitro*

Pengaruh dua atau lebih spesies mikrob antagonis yang ditempatkan dalam satu wadah, menyebabkan terbentuknya pertumbuhan koloni yang normal dan abnormal. Pertumbuhan koloni mikrob yang normal



ditunjukkan oleh pertumbuhan koloni yang sesuai standar yaitu tidak saling menghambat. Diameter koloni mikroba antagonis pada media King's B maupun PDA bervariasi bergantung pada jenis isolat mikroba antagonis dan media tumbuhnya. Diameter koloni mikroba tersebut berkisar 0,20 sampai 3,75 cm.

Percobaan seri pertama pada media King's B, tampak bahwa diameter koloni *B. subtilis*, yang ditempatkan secara tunggal maupun gabungan dalam satu cawan petri masing-masing 1,25; 0,75; 0,45; dan 1,25 cm, sedang pada media PDA berturut-turut 0,40; 0,20; 0,25; dan 0,35 cm. Selanjutnya pada percobaan seri kedua pada media King's B, tampak bahwa diameter koloni *P. fluorescens* yang ditempatkan secara tunggal maupun gabungan dalam satu cawan petri masing-masing 1,35; 0,85; 0,95; dan 1,75 cm, sedang pada media PDA berturut-turut ialah 0,50; 0,35; 0,50; dan 0,45 cm (Tabel 3). Namun apabila *P. fluorescens* yang digabungkan dengan *B. subtilis* dan *T. harzianum* tampak terhambat oleh adanya *P. fluorescens* tersebut.

Pada percobaan seri ketiga pada media King's B, tampak bahwa diameter koloni *T. harzianum* yang

ditempatkan secara tunggal maupun gabungan dalam satu cawan petri masing-masing ialah 1,15; 1,35; 2,00; dan 1,45 cm, sedang pada media PDA berturut-turut 3,75; 3,25; 3,15; dan 3,25 cm (Tabel 3).

Kriteria indeks kompatibilitas yang dihitung berdasarkan rumus Hamilton & Attia (1997) menunjukkan bahwa semua mikroba antagonis yang diuji dan dibiakkan pada media King's B kompatibel satu sama lainnya. Hal tersebut ditunjukkan oleh nilai indeks kompatibilitas yang lebih kecil dari 1 yaitu berkisar antara 0,58 sampai 0,85 (Tabel 3). Sejalan dengan hal tersebut Suryana & Cahyono (2008) melaporkan bahwa apabila dua atau lebih spesies mikroba ditempatkan dalam suatu wadah dan mikroba tersebut tidak saling menghambat, maka mikroba tersebut bersifat kompatibel. Hal ini berarti bahwa *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum* dapat diformulasikan dalam satu formula yang banyak mengandung protein.

Bahan dasar media King's B ialah protease pepton (protein) dan agar-agar, kandungan utama Protease pepton ialah asam amino, sedangkan agar-

Tabel 3. Diameter koloni *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *T. harzianum*, dan reaksinya pada uji kompatibilitas pada media King's B dan PDA (Diameter of *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *T. harzianum* colonies, and its reaction at compatibility test on King's B and PDA medium)

Perlakuan (Treatments)	Kompatibilitas beberapa mikroba antagonis pada media (Compatibilities of antagonist microbe on medium)					
	King's B			PDA		
	Diameter koloni (Colony diameter), cm	Indeks kompatibilitas (Compatibilities index)	Reaksi (Reaction)	Diameter koloni (Colony diameter), cm	Indeks kompatibilitas (Compatibilities index)	Reaksi (Reaction)
Bs tunggal	1,25	-	-	0,40	-	-
Bs x Pf	0,75	1,67	Tidak kompatibel (Not compatible)	0,20	2,00	Tidak kompatibel (Not compatible)
Bs x Th	0,45	2,78	Tidak kompatibel (Not compatible)	0,25	1,60	Tidak kompatibel (Not compatible)
Bs x Pf x Th	1,25	1,00	Kompatibel (Compatible)	0,35	1,14	Tidak kompatibel (Not compatible)
Pf tunggal	1,35	-	-	0,50	-	-
Pf x Bs	0,85	1,59	Tidak kompatibel (Not compatible)	0,35	1,43	Tidak kompatibel (Not compatible)
Pf x Th	0,95	1,42	Tidak kompatibel (Not compatible)	0,50	1,00	Tidak kompatibel (Not compatible)
Pf x Bs x Th	1,75	0,77	Kompatibel (Compatible)	0,45	1,11	Tidak kompatibel (Not compatible)
Th tunggal	1,15	-	-	3,75	-	-
Th x Bs	1,35	0,85	Kompatibel (Compatible)	3,25	1,15	Tidak kompatibel (Not compatible)
Th x Pf	2,00	0,58	Kompatibel (Compatible)	3,15	1,19	Tidak kompatibel (Not compatible)
Th x Bs x Pf	1,45	0,79	Kompatibel (Compatible)	3,25	1,15	Tidak kompatibel (Not compatible)

Keterangan (Remarks) : - = Reaksi kompatibilitas tidak diuji (No compatibilities test)



Tabel 4. Waktu inkubasi dan perkembangan jumlah tanaman layu (JTL) kentang pada 41–62 HST (Incubation times and development of potato wilted plants at 41 to 62 DAT)

Perlakuan (Treatments)	Waktu inkubasi (Incubation times) Hari (Days)	Tanaman layu pada ... HST (Wilted plants at ... DAT), %				Penekanan JTL (Suppression wilt), %
		41	48	55	62	
<i>B. subtilis</i>	24	1,96 a*	1,96 a	1,96 b	2,68 b	35,27
<i>P. fluorescens</i>	12	1,96 a	1,96 a	1,96 b	3,72 b	10,14
<i>T. harzianum</i>	11	2,68 a	2,68 a	3,72 a	5,21 a	-
<i>B. subtilis</i> x <i>P. fluorescens</i>	11	1,96 a	2,68 a	2,68 ab	3,72 b	10,14
<i>B. subtilis</i> x <i>T. harzianum</i>	16	1,96 a	1,96 a	2,68 ab	3,72 b	10,14
<i>P. fluorescens</i> x <i>T. harzianum</i>	11	1,96 a	1,96 a	3,24 a	5,21 a	-
<i>B. subtilis</i> x <i>P. fluorescens</i> x <i>T. harzianum</i>	16	1,96 a	1,96 a	1,96 b	2,68 b	35,27
Streptomisin sulfat 20%, 2 g/l	12	1,96 a	1,96 a	2,68 ab	4,88 a	-
Kontrol (air steril, tanpa mikroba antagonis)	4	1,96 a	1,96 a	1,96 b	4,14 a	-
KK (CV), %		21,17	19,07	17,09	17,07	

* Angka rerata yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda duncan pada taraf nyata 5% (Mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to duncan multiple range test), - Tidak dapat menekan *R. solanacearum* (No suppressing), Data JTL ditransformasi $\sqrt{x + 0,05}$ (Wilted plants data was transformed to $\sqrt{x + 0,05}$)

agar merupakan suatu kompleks karbohidrat yang diekstraksi dari alga marin genus *Gelidium*. Asam amino dan karbohidrat tersebut masing-masing sangat diperlukan sebagai energi bagi bakteri kelompok kemoheterotrop dan cendawan (Hadioetomo 1993).

Penelitian In Vivo

Waktu Inkubasi dan Persentase Tanaman Layu

Timbulnya gejala penyakit layu akibat serangan *R. solanacearum* pada tanaman kentang bervariasi bergantung pada kemangkusan masing-masing perlakuan. Persentase jumlah tanaman layu tersebut berkisar antara 1,96 sampai 5,21%, dengan waktu inkubasi berkisar antara 4 sampai 24 HSI (Tabel 4). Hal ini berarti bahwa setiap perlakuan mempunyai waktu inkubasi yang berbeda. Agrios (1988) melaporkan bahwa gejala penyakit dapat timbul apabila terjadi interaksi antartiga faktor yaitu patogen yang bervirulensi tinggi, inang yang rentan, dan faktor lingkungan yang kondusif. Apabila salah satu faktor tidak dipenuhi, maka gejala penyakit tidak dapat timbul dan ketiga faktor tersebut dikenal dengan sebutan segitiga penyakit.

Perlakuan *B. subtilis* yang diaplikasikan secara tunggal, menunjukkan waktu inkubasi yang paling lama, yaitu 24 HSI, sedangkan perlakuan kontrol menunjukkan waktu inkubasi yang paling cepat, yaitu 4 HSI. Waktu inkubasi terlama kedua ditunjukkan oleh perlakuan gabungan antara *B. subtilis* dan *T. harzianum*, serta gabungan antara *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan *T. harzianum*, yaitu sama-sama 16 HSI. Menurut Nur Aeny (2001), waktu inkubasi bakteri patogen ini bergantung pada daya virulensinya terhadap masing-masing tanaman inang dengan kisaran 14,60–39,30 hari.

Pada umur 41–48 HST pengaruh perlakuan mikroba antagonis baik yang diaplikasikan secara tunggal maupun gabungan, belum tampak jelas. Semua perlakuan menunjukkan jumlah tanaman layu sebanyak 1,96%, kecuali perlakuan *T. harzianum* secara tunggal dan gabungan antara *B. subtilis* dan *P. fluorescens* menunjukkan jumlah tanaman layu yang sama, yaitu sebanyak 2,68%.

Pada umur 55–62 HST pengaruh perlakuan *B. subtilis* baik secara tunggal maupun yang dikombinasikan dengan *P. fluorescens* dan *T. harzianum*, nyata lebih efektif dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini ditunjukkan oleh rendahnya jumlah tanaman layu pada perlakuan tersebut. Persentase jumlah tanaman layu pada 62 HST perlakuan tersebut masing-masing 2,68%. Kemampuan *B. subtilis* dalam menekan penyakit layu bakteri pada tanaman kentang didukung oleh penelitian Salerno & Sagardoy (2003) yang melaporkan bahwa *B. subtilis* dapat menekan serangan *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* pada tanaman kedelai sebesar 85%.

Kolonisasi Mikroba Antagonis pada Akar, Persentase Penekanan, dan AUDPC Jumlah Tanaman Layu

Berdasarkan data jumlah tanaman layu, perlakuan *B. subtilis* baik secara tunggal maupun yang dikombinasikan dengan *P. fluorescens* dan *T. harzianum*, merupakan perlakuan yang efektif mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang. Hal tersebut ditunjukkan oleh persentase jumlah tanaman layu dan penekanan yang sama rendahnya, yaitu masing-masing 2,68 dan 35,27% (Tabel 4). Namun dilihat dari nilai AUDPC jumlah tanaman layu, maka perlakuan *B. subtilis* yang diaplikasikan secara tunggal paling efektif mengendalikan *R. solanacearum* pada



Tabel 5. Kolonisasi mikrob antagonis pada akar dan AUDPC jumlah tanaman kentang layu (*Colonization of root antagonist microbe and potatoes wilted plants AUDPC*)

Perlakuan (Treatments)	Populasi mikrob antagonis (Population of antagonist microbe), cfu/g akar (cfu/g roots) *	AUDPC JTL (Wilt AUDPC)
<i>B. subtilis</i>	Bs : 6,70 b	23,35 d
<i>P. fluorescens</i>	Pf : 8,95 a	69,97 c
<i>T. harzianum</i>	Th : 4,60 c	256,69 a
<i>B. subtilis</i> x <i>P. fluorescens</i>	Bs : 5,85 bc Pf : 7,78 a	151,69 b
<i>B. subtilis</i> x <i>T. harzianum</i>	Bs : 6,70 b Th : 6,70 b	93,35 c
<i>P. fluorescens</i> x <i>T. harzianum</i>	Pf : 4,70 c Th : 4,60 c	198,32 b
<i>B. subtilis</i> x <i>P. fluorescens</i> x <i>T. harzianum</i>	Bs : 6,70 b Pf : 7,48 a Th : 5,85 bc	46,66 d
Streptomisin sulfat 20%, 2 g/l	Bs : 2,30 d	128,35 bc
Kontrol	Bs : 2,30 d Pf : 2,48 d	93,35 c
KK (CV),%	7,09	27,19

* Transformasi (*Transformation*) (Log 10x)

kentang. Hal tersebut ditunjukkan oleh tingginya nilai penekanan JTL, dan rendahnya nilai AUDPC jumlah tanaman layu. Persentase penekanan dan nilai AUDPC perlakuan tersebut masing-masing ialah 35,27 dan 23,35% (Tabel 4 dan 5).

Dilihat dari data kolonisasi perlakuan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* secara tunggal maupun gabungan, maka populasi *B. subtilis* yang mengkolonisasi akar kentang lebih rendah daripada *B. subtilis* dan *R. solanacearum* yang diaplikasikan secara tunggal masing-masing 6,70 dan 8,95 cfu/ml, sedangkan yang diaplikasikan secara gabungan masing-masing 5,85 dan 7,78 cfu/ml (Tabel 5). Hal ini berarti mekanisme penekanan *B. subtilis* terhadap *R. solanacearum* bukan disebabkan oleh kolonisasi, tetapi penyebab lain yang diduga efek antibiosis. Sehubungan dengan hal tersebut Katz & Demain (1977), Krezel & Leszezynska (1978), Baker *et al.* (1983), Peypoux *et al.* (1978), Pusey *et al.* (1986) melaporkan bahwa *B. subtilis* mengeluarkan suatu antibiotik yang diduga dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan *R. solani*. Salah satu jenis antibiotik yang disekresikan oleh *B. subtilis* ialah Xanthobacidin (Huang & Chang 1975).

KESIMPULAN

1. Isolat *P. fluorescens* 2 yang diisolasi dari rizosfer krisan, Segunung (Pf2), *B. subtilis* diperoleh dari IPB (Bs12), dan *T. harzianum* 1 diperoleh dari UGM (Th 1) masing-masing bersifat kompatibel satu dengan lainnya pada media yang banyak mengandung protein (King's B), tetapi tidak semua

kompatibel pada media yang banyak mengandung karbohidrat (PDA).

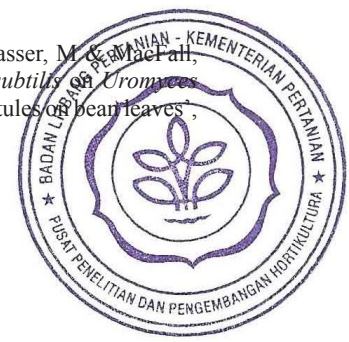
2. Perlakuan *B. subtilis* secara tunggal, merupakan perlakuan yang paling efektif mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, melalui Proyek Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) Tahun Anggaran 2009 disalurkan ke Universitas Padjadjaran Bandung, Balai Penelitian Tanaman Sayuran, dan Balai Penelitian Tanaman Hias, yang telah membiayai penelitian ini. Penulis mengucapkan terima kasih juga kepada Sdr/Sdri. Rian Triyanti Rupendi, Dida Adityana, Dra. O. Setiani Gunawan, M.S., Endang Sutarya, Dede Surachman, Ridwan Daleni, Muhidin, Dadang Kusnandar, Ade Sulaeman, Iskandar Sanusie, M. Irman Firmansyah, Arlan Hernawan, Asep Samsudin, dan semua pihak yang telah membantu pelaksanaan dan pelaporan penelitian ini.

PUSTAKA

1. Agrios, GN 1988, *Plant pathology*, third eds., Academic Press, Inc.
2. Baker, CJ, Stavely, JR, Thomas, CA, Sasser, M & Staveland, JS 1983, 'Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves', *Phytopathol.*, no. 73, pp. 1148-52.



3. Gunawan, OS 1987a, 'Pegendalian penyakit layu bakteri (*Pseudomonas solanacearum*) pada tanaman kentang dengan agrimisin', *Bul. Penel. Hort.*, vol. XV, no. 4, hlm. 45-8.
4. Gunawan, OS 1987b, 'Taksiran kehilangan hasil produksi kentang yang disebabkan oleh *Pseudomonas solanacearum* Smith', *Bul. Penel. Hort.*, vol. XV, no. 1, hlm. 100-103.
5. Hadioetomo, RS 1993, *Mikrobiologi dasar dalam praktek*, Cetakan ketiga, PT. Gramedia Pusaka Utama, Jakarta.
6. Hamilton, JT & Attia, FI 1997, 'Effect of mixtures of *Bacillus thuringiensis* and pesticide on *Plutella xylostella* and the parasite *Thyraella collaris*', *J. Econ. Entomol.*, vol. 70, no. 1, pp. 146-48.
7. Hanudin 1997, 'Distribution of races and biovars of *Pseudomonas solanacearum* in Java, Indonesia', Asian Vegetable Research and Development Center, *Publication*, no. 97, pp. 95-101.
8. Hanudin & Marwoto, B 2003, 'Pengendalian penyakit layu bakteri dan akar gada pada tanaman tomat dan caisim menggunakan *Pseudomonas fluorescens*', *J. Hort.*, vol. 13, no. 1, hlm. 58-66.
9. Hanudin, Marwoto, B, Saefuloh, A, Mulya, K & Machmud, M 2004a, 'Formula cair *Pseudomonas fluorescens* untuk pengendalian *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir', *J. Hort. (Ed. Khusus)*, vol. 14, hlm. 403-9.
10. Hanudin, Silvia, E, Marwoto, B, Suhardi, & Handayati, W 2004b, 'Skrining antagonistik beberapa strain *Bacillus* spp. terhadap *Rhizoctonia solani* isolat krisan', *J. Penel. dan Inf. Pertanian Agrin.*, vol. 8, no. 1, hlm. 1-5.
11. Hanudin, Marwoto, B, Tjahjono, Mulya, K & Machmud, M 2009, *Komposisi biopestisida cair berbahan aktif Bacillus subtilis dan Pseudomonas fluorescens Pf18 untuk pengendalian penyakit tanaman hias dan tanaman lainnya*, No. I D. 0 022 384, Paten Indonesia.
12. Haryadi 2001, 'Control of seed-borne late blight (*Phytophthora infestans*) development from treated potato seed-pieces with *Trichoderma* spp.', *Prosiding kongres XVI dan seminar nasional Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*, Bogor, hlm. 150-54.
13. Huang, TC & Chang, MC 1975, 'Studies on xanthobacillin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against xanthomonas', *Bot. Bul. Acad. Sinica*, no. 16, pp. 137-48.
14. Hsu, ST, Chen, CC, Liu, HY & Tzeng, KC 1994, 'Colonization of roots and control bacterial wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*', *ACIAR (Australia) Proceeding.*, no. 45, pp. 305-11.
15. Hersanti, R, Rupendi, T, Purnama, A, Hanudin, Marwoto, B & Gunawan, OS 2009, 'Penapisan beberapa isolat *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Trichoderma harzianum* yang bersifat antagonistik terhadap *Ralstonia solanacearum* pada tanaman kentang', *J. Agrikultura*, vol. 20, no. 3, hlm. 198-203.
16. Jeger, MJ & Viljanen-Rollinson, SLH 2001, 'The use of the area under diseases-progress curve to assess quantitative disease resistance in crop cultivars', *Theor Appl. Genet.*, no. 102, pp. 32-40.
17. Katz, E & Demain, AL 1977, 'The peptide antibiotics of bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions', *Bacteriol. Rev.*, no. 41, pp. 449-74.
18. Krezel, Z & Leszczynska, D 1978, 'Antibiotic activity of *Bacillus subtilis* 93 to some phytopathogenic microorganisms', *Med Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.*, no. 43, pp. 859-65.
19. Nur Aeny, T 2001, 'Patogenisitas bakteri layu pisang (*Ralstonia solanacearum*) pada beberapa tanaman', *J. Hama Penyakit Tumbuhan Tropika*, no. 1, hlm. 60-2.
20. Nuryani, W, Hanudin, Djatnika, I, Silvia, E & Muhidin 2003, 'Pengendalian hayati *Fusarium* pada anyelir dengan formulasi *Pseudomonas fluorescens*, gliocladium, dan *Trichoderma harzianum*', *J. Fitopatol. Ind.*, vol. 7, no. 2, hlm. 71-5.
21. Peypoux, F, Guinand, M, Georges, M, Delcombe, L, Das, BC & Lederer, E 1978, 'Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*', *Biochem.*, no. 17, pp. 3992-96.
22. Pusey, PL, Wilson, CL, Hotchkiss, MW & Franklin, JD 1986, 'Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold storage conditions', *Plant Dis.*, no. 70, pp. 587-90.
23. Salerno, CM & Sagardoy, MA 2003, 'Short communication : antagonistic activity by *Bacillus subtilis* against *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* under controlled condition', *Spanish J. Agric. Res.*, vol. 1, no. 2, pp. 55-8.
24. Skoglund, LG, Seal, S, Elphinstone, JG & Berrios, DE 1994, 'Study of latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum* in Burundi', *Bacterial Wilt. Proceeding of an Inter. Conf. ACIAR*, no. 45, pp. 106-10.
25. Suryana, A & Cahyono, D 2008, *Teknologi pembuatan pupuk dan biopestisida organik*, Diklat peningkatan kompetensi pegawai dan guru pertanian, RAPED, Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta.

