

## KAJIAN MIKROBA RIZOSFER DI KAWASAN PERTANIAN ORGANIK KEBUN PERCOBAAN CANGAR

Restu Rizkyta Kusuma, Luqman Qurata Aini, dan Luthfiyyah Khoirunnisaa<sup>1)</sup>

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya

Email : restukusuma@ub.ac.id

### PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa*. L) merupakan tanaman pangan utama pada sebagian besar penduduk Indonesia. Padi merupakan produk ekonomi penting yang menempati urutan ketiga di dunia, setelah jagung dan gandum. Pentingnya permasalahan terkait bahan pangan pokok ini tidak diragukan lagi. Hawar daun bakteri (HDB), merupakan salah satu penyakit tanaman padi yang penting di negara-negara penghasil padi di dunia, termasuk di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Zhang and Wang, 2013; Sudir *et al.*, 2012).

Genus *Xanthomonas*, merupakan bakteri yang memiliki flagel polar, berpigmen kuning dan merupakan bakteri gram negatif. Bakteri ini menginfeksi hampir 400 tanaman inang yang berbeda, termasuk tanaman yang memiliki nilai ekonomis penting seperti padi, kapas, kedelai, minyak lobak, jeruk, dan pisang (Leys *et al.*, 1984). Karakteristik dari genus ini adalah produksi lapisan kuning, yaitu pigmen pengikat membran yang disebut xanthomonadin (Starr, 1981). Xanthomonadin dapat melindungi *Xanthomonas* spp. dari kerusakan *photobiological* dan peroksidasi disebabkan oleh mekanisme pertahanan inang dan diperlukan untuk bertahan hidup secara epifit dan untuk menginfeksi inang (Goel *et al.*, 2001).

Upaya pengendalian HDB terkendala oleh kemampuan patogen untuk membentuk strain baru yang lebih virulen sehingga teknologi pencarian varietas yang tahan terhadap HDB menjadi kurang efektif. Sementara itu, penggunaan pestisida berupa bahan kimia anti bakteri diketahui dapat menyebabkan gangguan pada kesehatan manusia dan lingkungan karena meninggalkan residu (Wahyudi, 2011). Arah pengendalian OPT di Indonesia adalah menggunakan konsep Pengendalian Hama Terpadu (PHT) yang menerapkan 4 prinsip, salah satunya adalah penayagunaan dan pelestarian musuh alami. Agens hayati adalah salah satu jenis musuh alami yang selama ini banyak dikembangkan oleh peneliti. Agens hayati merupakan mikroba yang bersifat antagonis terhadap patogen penyakit tumbuhan. Agens hayati hampir dapat ditemukan dimanapun di lingkungan alami. Tanah mengandung berbagai jenis mikroorganisme termasuk bakteri yang dapat hidup di lingkungan alam (Gowsalya *et al.*, 2014).

Salah satu indikasi kelimpahan mikroorganisme yang hidup di tanah adalah kandungan bahan organik (Supriyadi, 2008). Bahan organik merupakan sumber energi bagi flora dan fauna tanah baik makro maupun mikro. Penambahan bahan organik dalam tanah akan menyebabkan aktivitas dan populasi mikrobiologi dalam tanah meningkat, terutama yang berkaitan dengan aktivitas dekomposisi dan mineralisasi bahan organik. Beberapa mikroorganisme yang berperan dalam dekomposisi bahan organik adalah jamur, bakteri dan aktinomisetes (Atmojo, 2003).

Tanah kawasan organik pada kebun percobaan Cangar-Malang diketahui memiliki kandungan bahan organik yang rata-rata tinggi yakni sebesar 2-3% (Kharis, 2012) sehingga diduga terdapat banyak mikroorganisme berupa bakteri yang hidup didalamnya. Hasil analisa tanah pada survey pendahuluan yang telah dilakukan diketahui tanah kawasan organik cangar

memiliki kandungan bahan organik 4,75. Berdasarkan permasalahan yang telah dipaparkan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri pada tanah kawasan organik yang bersifat antagonis terhadap bakteri patogen Xoo.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan rumah kaca Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2015 sampai bulan Juni 2016. Penelitian dilaksanakan dalam 5 tahap yakni: (1) eksplorasi bakteri antagonis pada tanah kawasan organik, (2) uji antagonis bakteri dari tanah kawasan organik terhadap bakteri Xoo secara *in vitro*, (3) karakterisasi dan identifikasi bakteri antagonis secara morfologi dan biokimia, (4) uji antagonis bakteri terpilih dari tanah kawasan organik terhadap bakteri Xoo secara *in vitro* dan (5) uji penekanan penyakit HDB pada tanaman padi (*in vivo*).

### Eksplorasi Bakteri Pada Tanah Kawasan Organik

Eksplorasi bakteri pada tanah kawasan organik dilakukan dengan metode acak. Pengambilan sampel dilakukan pada lahan kawasan organik di kebun percobaan Universitas Brawijaya yang berada di Cangar, Bumiaji, Kota Batu. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil sampel tanah pada 3 titik secara acak pada kedalaman 5-10 cm. Sampel yang telah diambil pada setiap titik dihomogenkan. Sampel yang telah dihomogenkan, diambil dan ditimbang sebanyak 1 gram dan diberi aquadest steril sebanyak 10 ml. Setelah itu diambil sebanyak 1 ml untuk dilakukan pengenceran dari  $10^1$  hingga  $10^9$ . Selanjutnya penanaman bakteri dilakukan dengan metode *spread plate*, dengan mengambil masing-masing 0,1 ml pada pengenceran  $10^7$ ,  $10^8$ , dan  $10^9$  diteteskan pada media NA padat. Setelah itu diinkubasikan pada suhu ruang selama 2x24 jam.

### Uji Antagonis Bakteri Eksplorasi Terhadap Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secara *in vitro*.

Uji antagonis dilakukan di laboratorium dengan menggunakan metode *spray* (pengkabutan) modifikasi dari Kawaguchi *et al.* (2008). Bakteri hasil eksplorasi yang telah diinkubasikan selama 2x24 jam dipurifikasi pada media NA baru. Bakteri yang tumbuh setelah purifikasi diambil masing-masing 1-2 goresan jarum ose, kemudian dimasukkan dalam tabung dan ditambah aquadest steril sebanyak 1 ml. Kertas saring steril yang telah dipotong dengan diameter 5 mm dimasukkan pada tabung yang berisi bakteri hasil eksplorasi, dan direndam selama  $\pm 1$  menit kemudian ditiriskan selama  $\pm 1$  jam. Setelah ditiriskan, kertas saring diletakkan pada permukaan media NA padat pada cawan Petri, kemudian diinkubasikan selama 2x24 jam. Bakteri Xoo yang telah ditumbuhkan pada media NA diambil 1-2 goresan jarum ose dan dimasukkan pada *sprayer* yang telah diisi aquadest steril 10 ml. Suspensi bakteri Xoo tersebut disemprotkan pada cawan Petri yang sebelumnya telah diberi kertas saring yang mengandung bakteri hasil eksplorasi. Setelah itu diinkubasikan kembali selama 24 jam, kemudian diamati dan diukur zona bening atau zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri antagonis terhadap bakteri patogen.

### Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Antagonis

Identifikasi bakteri yang ditemukan dari hasil eksplorasi berpedoman pada buku *Bergey's Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001). Beberapa metode yang digunakan untuk identifikasi antara lain: uji hipersensitif, uji Gram

(pewarnaan Gram dan uji KOH), pewarnaan spora, uji Oksidatif-Fermentatif (OF), uji katalase, pigmen fluorescens, media selektif YDC.

### Uji Penekanan Pada Tanaman Padi

#### a. Penanaman tanaman padi

Penanaman padi dilakukan di rumah kaca dengan menggunakan wadah. Bahan tanam yang digunakan yakni padi varietas IR-64. Bahan tanam yang akan digunakan direndam dengan air terlebih dahulu untuk menyeleksi benih yang bernas atau tidak. Media tanam yang digunakan yakni tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 yang disterilisasi terlebih dahulu dengan formalin 4%, ditutup plastik dan dibiarkan selama seminggu. Selanjutnya media tanam dikeringanginkan selama 7 hari. Setelah itu media dimasukkan pada ember. Sebelum dilakukan penanaman media tanam disiram dengan air terlebih dahulu dan dibuat lubang tanam sedalam  $\pm 5$  cm. Pemeliharaan tanaman dilakukan setiap hari sekali. Pemeliharaan yang dilakukan meliputi penyiraman, penyiangan gulma, dan pemupukan.

#### b. Persiapan bakteri

Bakteri hasil eksplorasi dipurifikasi dan diinkubasikan pada media *nutrient agar* (NA). bakteri yang akan diinokulasikan dibuat suspensinya terlebih dahulu. Suspensi bakteri yang digunakan mempunyai kerapatan  $10^9$  cfu/ml.

#### c. Inokulasi bakteri antagonis

Inokulasi bakteri antagonis dilakukan pada tanaman yang berumur 1 bulan dengan metode *pin prick* modifikasi dari Volksch and May (2001). Suspensi bakteri antagonis disiapkan terlebih dahulu dengan kerapatan  $10^9$  cfu/ml. Daun tanaman yang akan diberi perlakuan dilubangi menggunakan jarum sebanyak 3 lubang tiap daun. Penyemprotan antagonis dilakukan pada bagian daun tanaman yang merupakan tempat sering menjadi sasaran serangan bakteri patogen Xoo. Suspensi bakteri antagonis yang telah disiapkan sebelumnya disemprotkan menggunakan *sprayer* pada bagian daun tanaman hingga terbentuk butiran-butiran semprotan yang terlihat oleh mata. Selanjutnya daun yang telah disemprot disungkup dengan menggunakan plastik selama 24 jam.

#### d. Inokulasi bakteri patogen Xoo

Suspensi bakteri patogen yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu 2 hari sebelum inokulasi. Inokulasi dilakukan satu hari setelah inokulasi antagonis. Suspensi yang digunakan memiliki kerapatan  $10^9$  cfu/ml. Inokulasi dilakukan dengan cara menyemprotkan suspensi bakteri pada bagian yang telah dilubangi dengan jarum. Penyemprotan dilakukan sampai terbentuk butiran-butiran semprotan yang terlihat oleh mata. Daun selanjutnya daun yang telah disemprot disungkup dengan menggunakan plastik selama 24 jam.

### Variabel Pengamatan dan Analisis Data

Variabel penelitian yang diamati antara lain zona hambat bakteri antagonis, identifikasi, masa inkubasi penyakit, dan intensitas penyakit. Data pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) pada taraf kesalahan 5 %. Jika didapatkan hasil berbeda nyata maka dilanjutkan dengan Uji Duncan dengan taraf 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Seleksi Bakteri Hasil Eksplorasi yang Bersifat Antagonis Terhadap *Xanthomonas oryzae pv oryzae* Pada Cawan Petri (*In Vitro*)

Eksplorasi bakteri yang dilakukan pada tanah kawasan organik didapatkan total 21 isolat bakteri. Masing-masing isolat diuji kemampuan antagonisnya terhadap bakteri patogen Xoo. Dari 21 isolat yang diuji, terdapat 5 bakteri hasil eksplorasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, yaitu isolat E3, E4, E16, E19 dan E21. Penghambatan ditunjukkan dengan adanya zona hambat (zona bening) yang muncul di sekitar kertas saring yang mengandung bakteri hasil eksplorasi. Selanjutnya isolat terpilih tersebut dilakukan uji lanjutan pada cawan Petri.

### Pengujian Antagonis Bakteri Hasil Eksplorasi Terhadap Bakteri Patogen *Xanthomonas oryzae pv oryzae* pada Cawan Petri (*In Vitro*)

Hasil pengujian daya antagonis bakteri hasil eksplorasi dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil analisis menggunakan uji sidik ragam (ANOVA) dengan taraf kesalahan 5% menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh perlakuan dalam menghambat pertumbuhan Xoo selama 48 jam.

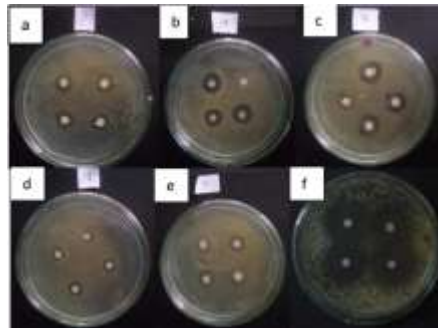
Tabel 1. Rerata zona hambat bakteri antagonis terhadap bakteri patogen Xoo)

Perlakuan	Rerata zona hambat bakteri hasil eksplorasi terhadap Xoo (mm) pada 1 dan 2 HSI	
	1	2
Isolat E3	11,25 abc	11,25 abc
Isolat E14	13,75 bc	13,75 bc
Isolat E16	15,00 c	15,00 c
Isolat E19	9,75 ab	9,75 ab
Isolat E21	8,88 a	8,88 a
Bakterisida	24,25 d	24,25 d

\*HIS : Hari Setelah Inokulasi.

\* Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan

Pada pengamatan 1 HSI dan 2 HSI diperoleh hasil yang sama. Diketahui semua isolat bakteri uji mampu menghasilkan zona hambat. Rerata zona hambat yang dihasilkan oleh semua isolat lebih kecil daripada bakterisida. Zona hambat terbesar terdapat pada P6 (Bakterisida), dengan rerata zona hambat sebesar 24,25 mm. Pada perlakuan bakteri hasil eksplorasi rerata zona hambat pada P1 (Isolat E3), P2 (Isolat E14) dan P3 (Isolat E16) menunjukkan hasil yang sama. Sedangkan rerata zona hambat pada P4 (Isolat E19) dan P5 (Isolat E21) memiliki rerata terkecil diantara semua perlakuan.



Gambar 1. Hasil pengujian antagonis bakteri hasil eksplorasi terhadap bakteri patogen Xoo pada cawan Petri (*in vitro*) pada 48 jam, (a) P1 (Isolat E3) (b) P2 (Isolat E14) (c) P3 (Isolat E16) (d) P4 (Isolat E19) (e) P5 (Isolat E21) (f) P6 (Bakterisida)

**Karakteristik Morfologi**

Bakteri yang diamati ditumbuhkan pada media NA dengan metode *streak* tunggal dengan umur 24 jam. Pengamatan morfologi koloni mengacu pada Cappucino (2005). Pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk, warna, tepi, elevasi dan terdapat mucooid atau tidak. Hasil pengamatan morfologi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Ciri-ciri morfologi koloni tunggal bakteri antagonis

Isolat	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Mucooid
E3	bulat	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucooid
E14	bulat	Putih Keruh	Bergelombang	Datar	Mucooid
E16	bulat	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucooid
E19	bulat	Putih Keruh	Rata	Cembung	Mucooid
E21	bulat	Putih Keruh	Bergelombang	Datar	Mucooid

**Hasil Identifikasi Bakteri hasil eksplorasi**

Hasil identifikasi melalui uji fisiologi dan biokimia dirangkum pada tabel 3, yaitu genus *Corynebacterium* sp. E19 genus *Clostridium* sp.

Tabel 3. Hasil uji fisiologi dan biokimia isolat bakteri antagonis 1

Uji Fisiologi dan Biokimia	E3	E14	E16	E19	E21
Uji Hipersensitif	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-
Pengujian KOH 3%	-	-	-	-	-
Pengujian Gram	+	+	+	+	+
Endospora	-	-	-	+	-
Katalase	+	+	+	+	+
Oksidatif-Fermentatif	TU <sup>2)</sup>	TU	TU	TU	TU

1)(-) bereaksi negatif; (+) bereaksi positif,

2)Tidak uji

Bakteri dengan kode isolat E3, E14, E16 dan E21 memiliki ciri-ciri morfologi sebagai berikut: bentuk koloni bulat, berwarna putih keruh, tepi bergelombang, elevasi datar dan bersifat sedikit mucooid. Hasil pengujian secara fisiologis dan biokimia menunjukkan reaksi negatif pada uji hipersensitif, termasuk bakteri Gram negatif dan memiliki bentuk sel basil pada pengujian KOH 3% dan pewarnaan Gram. Pada pengujian katalase bakteri bereaksi positif, yakni dengan terbentuknya gelembung udara. Menurut Bergey’s Manual of

Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut termasuk dalam genus *Corynebacterium*.

Sedangkan bakteri dengan kode isolat E19 memiliki ciri-ciri morfologi sebagai berikut: bentuk koloni bulat, berwarna kuning keruh, tepi rata, elevasi cembung dan bersifat mucoid. Hasil pengujian secara fisiologis dan biokimia menunjukkan reaksi negatif pada uji hipersensitif, termasuk bakteri Gram negatif dan memiliki bentuk sel basil pada pengujian KOH 3% dan pewarnaan Gram, memiliki endospora, dan pada pengujian oksidatif-fermentatif menunjukkan hasil positif pada kedua media uji yang menunjukkan bakteri mampu hidup secara aerob dan anaerob. Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.*, (2001) bakteri dengan ciri-ciri tersebut termasuk dalam genus *Clostridium*.

### **Pengujian Penekanan Bakteri Antagonis Terhadap Perkembangan Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi**

Hasil pengamatan masa inkubasi menunjukkan bahwa semua daun yang diinokulasi menunjukkan gejala yang sama, yakni terdapat bercak hawar berwarna kuning yang tidak teratur, semakin lama semakin menyebar dan berubah warna dari kuning menjadi kuning pucat hingga putih dan layu. Gejala tersebut serupa dengan yang dikemukakan oleh Wahyudi *et al.* (2001) dan Muneer *et al.* (2007).

Tabel 4. Hasil pengamatan masa inkubasi penyakit

Perlakuan	Rerata masa inkubasi (hari)
Isolat E3	3,25 b
Isolat E14	3 b
Isolat E16	3,75 b
Isolat E19	3 b
Isolat E21	3,5 b
Bakterisida	3,25 b
Aquadest	2,25 a

### **Intensitas penyakit**

Pengamatan intensitas penyakit yang terjadi relatif kecil. Pada minggu pertama hingga minggu ke-3 didapatkan hasil yang sama. Pada minggu ke-4 dan ke-5 hasil analisis sidik ragam (ANOVA) intensitas penyakit HDB didapatkan hasil yang berbeda nyata. Intensitas penyakit pada semua perlakuan bakteri antagonis lebih rendah dibandingkan kontrol menggunakan aquadest. Hal ini menunjukkan bahwa semua perlakuan bakteri antagonis dapat menurunkan intensitas penyakit HDB pada tanaman padi. Intensitas penyakit pada semua perlakuan bakteri antagonis tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan intensitas penyakit pada perlakuan bakterisida. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan bakteri antagonis dalam menekan perkembangan penyakit HDB sama dengan kemampuan yang ada pada aplikasi bakterisida.

Tabel 5. Hasil pengamatan uji antagonis secara *in vivo*

Perlakuan	Intensitas penyakit (%) pada Minggu Setelah Inokulasi (MSI) ke -				
	1	2	3	4	5
Isolat E3	16,7	16,7	16,7	16,7 a	16,7 a
Isolat E14	16,7	16,7	16,7	16,7 a	16,7 a
Isolat E16	16,7	16,7	16,7	16,7 a	16,7 a
Isolat E19	16,7	16,7	16,7	16,7 a	16,7 a
Isolat E21	16,7	16,7	16,7	16,7 a	16,7 a
Bakterisida	16,7	16,7	16,7	16,7 a	16,7 a
Aquadest	16,7	16,7	16,7	30,5 b	30,5 b

1)Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan

2)Minggu setelah inokulasi

Pada hasil pengamatan intensitas penyakit dapat diketahui bahwa bakteri antagonis mampu menekan perkembangan penyakit HDB pada daun tanaman padi. Hal ini disebabkan bakteri antagonis dapat menghasilkan senyawa antibiotik atau memiliki kemampuan menghasilkan enzim tertentu yang mampu menekan perkembangan penyakit HDB akibat bakteri patogen Xoo. Pada hasil karakterisasi dan identifikasi sebelumnya telah diketahui masing-masing genus isolat yang digunakan pada pengujian. Isolat E3, E14, E16 dan E21 termasuk kedalam genus *Corynebacterium* sp. Sedangkan E19 termasuk kedalam genus *Clostridium* sp.

### KESIMPULAN

Pada tanah kawasan organik kebun percobaan cangar ditemukan 21 isolat bakteri. Dari ke-21 isolat yang diperoleh terdapat 5 isolat dengan kode E3, E14, E16, E19 dan E21 yang bersifat antagonis terhadap bakteri patogen Xoo dan mampu menekan perkembangan penyakit HDB pada tanaman padi. Penghambatan terbesar dihasilkan oleh isolat dengan kode E16 sebesar 15 mm. Sedangkan untuk pengujian penekanan penyakit bakteri antagonis pada tanaman padi kelima isolat bakteri antagonis memiliki kemampuan yang sama.

Berdasarkan hasil karakterisasi dan identifikasi dari kelima isolat tersebut diketahui bahwa isolat dengan kode E3, E14, E16, dan E21 termasuk pada genus *Corynebacterium* sp. Sedangkan isolat dengan kode E19 termasuk pada genus *Clostridium* sp

### DAFTAR PUSTAKA

- Asaka, O. and Makoto S. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off o Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. J. Applied and Environmental Microbiology. 62(11):4081-4085.
- Atmojo, S.W. 2003. Peranan Bahan Organik Terhadap Kesuburan Tanah Dan Upaya Pengelolaannya. Surakarta. Sebelas Maret University Press
- Bais, H.P., R. Fall, and J.M. Vivanco. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. Plant Physiol. 123:307-319.