

KARAKTERISASI RIZOBAKTERI YANG BERPOTENSI MENGENDALIKAN BAKTERI *XANTHOMONAS ORYZAE PV. ORYZAE* DAN MENINGKATKAN PERTUMBUHAN TANAMAN PADI

Agustiansyah^{1*}, Satriyas Ilyas², Sudarsono², & Muhammad Machmud³

¹Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung
Jl. Prof. Soemantri Brodjonegoro No.1 Bandar Lampung 35145

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB.
Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680.

³Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
Jl. Tentara Pelajar N0.3A, Bogor 16111.

*penulis untuk korespondensi E-mail: agustiansyahn@yahoo.com

ABSTRACT

Characterization of rhizobacteri having potential to control *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* and increase plant growth of rice. Rhizobacteria which are isolated from root could produce HCN, siderophore, and plant growth regulator, induce systemic resistance, and are increase uptake of plant nutrition such as phosphate. The objective of this research was to characterize rhizobacteri as controlling agent for *Xanthomonas oryzae pv.oryzae* (Xoo) and as plant growth promoter. The results show that the isolates of *P. diminuta* A6, *P. aeruginosa* A54, *B. subtilis* 11 /C, and *B. subtilis* 5/B inhibited the growth of Xoo. *B. subtilis* 5/B isolate produced the highest siderophore activity, followed by of *P. aeruginosa* A54, *P. diminuta* A6 and *B. subtilis* 11/C. Only *P. diminuta* A6 isolate produced HCN. The results also showed that all rhizobacteri produced IAA i.e. *B.subtilis* 5/B (22.10 µg/ml), *B. subtilis* 11/C (19.05 µg/ml), *P. diminuta* A6 (8.68 ug/ml), and *P. aeruginosa* A54 (2.95 µg/ml). The content of phosphatase enzyme was as follows *B.subtilis* 5/B (2.78 units/ ml), *B.subtilis* 11/C (5.7 units/ml), *P. diminuta* A6 (2.25 units/ml), and *P. aeruginosa* A54 (5.71 units / ml). Content of peroxidase enzymes in plants that were treated by using isolates was as follows *B.subtilis* 5/B (1.30×10^{-3} units/mg protein), *P. aeruginosa* A6 (1.20×10^{-3} units/mg protein), *B.subtilis* 11/C (1.15×10^{-3} units/mg protein), and *P. aeruginosa* A54 (1.05×10^{-3} units/mg protein).

Key words: biological control, bacterial leaf blight, phytoestimulator, plant growth regulator.

ABSTRAK

Karakterisasi rizobakteri yang berpotensi mengendalikan bakteri *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* dan meningkatkan pertumbuhan tanaman padi. Rizobakteri yang diisolasi dari perakaran tanaman dapat memproduksi asam sianida (HCN), siderofor, zat pengatur pertumbuhan tanaman, menginduksi ketahanan sistemik tanaman, dan dapat meningkatkan penyerapan hara fosfat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter rizobakteri yang mengait dengan kemampuan mengendalikan bakteri *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo) penyebab penyakit hawar daun bakteri (HDB) dan kemampuan meningkatkan pertumbuhan tanaman. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat *P. diminuta* A6, *P. aeruginosa* A54, *B.subtilis* 11/C, dan *B.subtilis* 5/B memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan Xoo. Keempat isolat menghasilkan senyawa siderofor dengan aktivitas tertinggi pada isolat *B. subtilis* 5/B diikuti isolat *P. aeruginosa* A54, *P. diminuta* A6, dan *B.subtilis* 11/C. Hanya isolat *P. diminuta* A6 yang memproduksi senyawa HCN. Keempat isolat memproduksi IAA, enzim fosfatase, melarutkan fosfat, dan memiliki kandungan enzim peroksidase. Besarnya kandungan IAA masing-masing isolat adalah *B.subtilis* 5/B (22,10 µg/ml), *B.subtilis* 11/C (19,05 µg/ml), *P. diminuta* A6 (8,68 µg/ml), dan isolat *P. aeruginosa* A54 (2,95 µg/ml). Kandungan enzim fosfatase masing-masing adalah *B.subtilis* 5/B (2,78 unit/ml), *B.subtilis* 11/C (5,7 unit/ml), *P. diminuta* A6 (2,25 unit/ml), dan *P. aeruginosa* A54 (5,71 unit/ml). Kandungan enzim peroksidase adalah isolat *B.subtilis* 5/B ($1,30 \times 10^{-3}$ unit/mg protein), *P. aeruginosa* A6 ($1,20 \times 10^{-3}$ unit/mg protein), *B.subtilis* 11/C ($1,15 \times 10^{-3}$ unit/mg protein), dan *P. aeruginosa* A54 ($1,05 \times 10^{-3}$ unit/mg protein).

Kata kunci: agens hayati, fitostimultor, hawar daun bakteri, zat pengatur tumbuh.

PENDAHULUAN

Bakteri akar pemacu pertumbuhan tanaman (*plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR) saat ini semakin banyak dikembangkan, terutama dalam upaya peningkatan produksi pangan dan perbaikan kualitas lingkungan hidup. Penggunaan PGPR untuk pengurangan input kimia pertanian telah menjadi isu penting. Rizobakteri telah banyak diaplikasikan pada banyak tanaman karena dapat meningkatkan pertumbuhan, daya tumbuh benih di lapang, dan meningkatkan produksi tanaman. Beberapa rizobakteri telah diperdagangkan (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009; Herman *et al.*, 2008; Minorsky, 2008).

Mekanisme rizobakteri dalam mengendalikan penyakit maupun populasi patogen melalui beberapa cara yaitu produksi senyawa antibiosis, persaingan ruang atau nutrisi, persaingan pemanfaatan unsur Fe melalui produksi siderofor, induksi mekanisme ketahanan, inaktivasi faktor perkecambahan patogen, penguraian faktor kepatogenan seperti toksin, parasitisme yang melibatkan produksi enzim ekstrasel pendegradasi dinding sel, misalnya kitinase, β -1.3 glukukanase (Van Loon, 2007). Penyakit Hawar Daun Bakteri (HDB) yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo) dan defisiensi hara fosfor adalah kendala dalam budidaya padi yang menyebabkan rendahnya produktivitas tanaman. Menurut Vikal *et al.* (2007), HDB dapat menurunkan produksi sampai 50%. Ji *et al.* (2008) menyatakan pengurangan hasil berkisar 20-40%. Penyakit HDB juga merupakan penyakit terbawa benih (Agarwal & Sinclair, 1996; Veena *et al.*, 1996; Ilyas *et al.*, 2007).

Beberapa karakter penting rizobakteri dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman adalah menghasilkan hormon tumbuh seperti IAA (Karnwal, 2009), giberelin (Joo *et al.*, 2005), memfiksasi N (Park *et al.*, 2005; Hafeez *et al.* 2006), dan melarutkan P (Faccini *et al.*, 2004; Mehrvraz & Chaichi, 2008). Khusus pada kemampuan melarutkan P, rizobakteri seperti *Pseudomonas* spp. dan *Bacillus* spp. dapat mengeluarkan asam- asam organik seperti asam formiat, asetat, dan laktat yang bersifat dapat melarutkan bentuk-bentuk fosfat yang sukar larut tersebut sehingga menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman (Rao, 2007).

Dua kelompok bakteri yang dilaporkan dan banyak dikembangkan sebagai agens pengendalian hayati adalah kelompok *Bacillus* spp. dan *Pseudomonas* spp. khususnya pada tanaman padi. Gnanamanickam *et al.* (1999) menyatakan bahwa *Bacillus* spp. mampu mengendalikan Xoo penyebab HDB pada tanaman padi. Velusamy *et al.* (2006) melaporkan antibiotika 2.4

diacetylphloroglucinol (DAPG) yang diproduksi *P. fluorescens* mampu menghambat pertumbuhan HDB oleh patogen Xoo. Ilyas *et al.* (2007), melaporkan agens hayati dari kelompok *Bacillus* spp. mampu menghambat pertumbuhan koloni Xoo yang berasal dari benih padi yang diuji secara *in vitro*. Kemampuan agens hayati dalam meningkatkan pertumbuhan dan pengendalian penyakit pada berbagai komoditas telah banyak dilaporkan peneliti, tetapi informasi tentang penggunaan agens hayati dalam meningkatkan pertumbuhan, penyerapan hara fosfat, pengendalian penyakit, dan peningkatan mutu benih padi belum banyak dilaporkan, khususnya di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter rizobakteri kelompok *Pseudomonas* spp. dan *Bacillus* spp. yang mengait dengan kemampuan mengendalikan bakteri *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* penyebab HDB dan meningkatkan pertumbuhan tanaman padi.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor, Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Penelitian Bioteknologi IPB, dan Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB, dari April 2008 sampai Agustus 2009.

Isolasi Bakteri Antagonis dari Akar Padi. Bakteri diisolasi dari rizosfer padi sehat di antara tanaman padi terinfeksi Xoo. Isolasi rizobakteri dilakukan sebagai berikut: (1) sebanyak 10 gram akar padi dengan butiran tanah yang masih melekat di permukaan akar dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer berisi 100 ml air akuades steril; (2) labu erlenmeyer berisi sampel dikocok dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 30 menit; (3) suspensi yang didapat diencerkan secara berseri dari 10^{-1} sampai 10^{-10} dan setiap tahapan pengenceran dihomogenisasi berulang-ulang; (4) suspensi yang diperoleh disemaikan dalam medium agar King's B untuk menumbuhkan bakteri dari kelompok *Pseudomonas* spp. yang berpendar; (5) Biakan kultur bakteri yang diperoleh diinkubasi pada suhu ruangan selama 48 jam; (6) setiap koloni bakteri yang tumbuh diisolasi dan dibuat biakan murninya. Selanjutnya bakteri yang telah dimurnikan dipilih secara cepat untuk melihat kemampuan daya hambat patogen dengan cara menggosokkan bakteri yang diuji di atas media nutrient agar dalam cawan Petri melintasi/memotong goresan bakteri patogen. Bakteri rizofir yang berpotensi sebagai agens hayati diidentifikasi

menggunakan prosedur baku menurut Schaad *et al.* (2001).

Uji Daya Hambat Rizobakteri terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Uji daya hambat (uji antagonisme) terhadap Xoo secara *in vitro* dilakukan untuk memilih bakteri rizofir yang berpotensi sebagai agens hayati. Pengujian daya hambat rizobakteri terhadap patogen juga dilakukan pada isolat *Bacillus subtilis* 5/B dan isolat *Bacillus subtilis* 11/C yang merupakan koleksi penelitian sebelumnya. Biakan murni Xoo (Patotipe 4, asal BB Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi) berumur 48 jam dengan kerapatan $4,5 \times 10^8$ sel bakteri/ml skala 4 McFarland sebanyak 100 μ l, disebar dalam media *peptone sucrose agar* (PSA). Potongan kertas saring (diameter 1 cm) yang telah direndam dalam larutan yang mengandung agens hayati (dengan kerapatan $4,5 \times 10^8$ sel bakteri/ml) berumur 48 jam diletakkan di tengah cawan Petri yang selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dan setiap hari diamati. Pengamatan dilakukan dengan melihat pembentukan lingkaran zona hambatan (halo) Xoo oleh rizobakteri yang ada pada kertas saring. Masing-masing isolat agens hayati dilakukan pengujian dengan tiga ulangan. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur panjang diameter vertikal dan horizontal zona bening yang terbentuk. Nilai diameter daya hambat yang diperoleh dianalisis ragamnya dan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan.

Produksi Senyawa HCN. Produksi senyawa HCN kualitatif dianalisis dengan menggunakan metode yang dikembangkan Bekker & Schipper (Munif 2001). Isolat rizobakteri yang diuji ditumbuhkan pada media glisina dalam cawan petri. Pada bagian tutup cawan petri ditempelkan potongan kertas saring yang telah direndam dalam larutan untuk mendeteksi HCN (asam pikrat 2 g dan natrium karbonat 8 g, dalam 200 ml air). Biakan kultur bakteri diinkubasi pada suhu ruang. Sebagai petunjuk terbentuknya senyawa HCN akan terjadinya perubahan warna pada kertas saring. Warna kertas saring yang tetap kuning menunjukkan isolat yang diuji tidak memproduksi HCN sedangkan warna coklat muda, coklat tua dan merah bata menandakan produksi HCN yang semakin meningkat.

Produksi Siderofor. Produksi siderofor dari isolat rizobakteri yang diuji dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam media uji selama 24 jam pada suhu ruang. Komposisi per liter media yang digunakan adalah sukrosa 20 g, Lasparagin 2 g, K_2HPO_4 1 g, dan $MgSO_4$ 0,5 g. Suspensi rizobakteri disentrifius dengan kecepatan

11.000 rpm selama 30 menit. Supernatan disaring dengan membran nitroselulosa 0,2 μ m. Pendeteksian produksi siderofor oleh rizobakteri dilakukan dengan cara menambahkan 1 ml $FeCl$ 0,01 M ke dalam 3 ml supernatan dan sebagai pembanding supernatant tanpa penambahan $FeCl$. Deteksi siderofor diukur menggunakan spektrofotometer (model Novaspec II) pada panjang gelombang 410 nm (Dirmawati 2003).

Kemampuan Melarutkan Fosfat. Dalam pengujian kemampuan rizobakteri untuk melarutkan fosfat digunakan media agar *Pikovskaya* dengan penambahan *tri-calcium phosphate* (TCP) sebagai sumber fosfat. Komposisi per liter media yang digunakan terdiri atas glukosa 10 g, $NaCl$ 0,2 g, KCl 0,2 g, $MgSO_4$ 0,1 g, $MnSO_4$ 2,5 mg, $FeSO_4$ 2,5 mg, ekstrak khamir 0,5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g, dan agar 15 g. Media disterilkan dengan pemanasan menggunakan otoklaf dan setelah pH media diatur menjadi 7,2 dengan KOH 5 N. Media dituangkan ke dalam cawan Petri, dibuat lubang dengan pelubang gabus dan diisi dengan 0,5 ml suspensi isolat rizobakteri yang diuji. Media dengan bakteri diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Kemampuan melarutkan fosfat dari isolat yang diuji dievaluasi secara kualitatif berdasarkan terbentuknya halo di sekitar lubang yang berisi suspensi rizobakteri (Thakuria *et al.*, 2004).

Pengukuran Aktivitas Enzim Fosfatase. Pengukuran aktivitas enzim fosfatase dilakukan dengan mengikuti metode Heinonen dan Lahti (1981) dan Greiner *et al.* (1997) yang dikutip oleh (Budiansyah, 2010). Pengukuran didasarkan pada jumlah fosfat anorganik yang dapat dibebaskan dari mioinositol. Larutan sampel dibuat dengan cara, sebanyak 100 μ l asam fitat 1.0 mM dimasukkan ke dalam tabung mikro, kemudian ke dalamnya ditambahkan larutan penyangga natrium asetat 0,1 M pH 5 sebanyak 250 μ l. Setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, sebanyak 50 μ l sampel enzim dimasukkan ke dalamnya, kemudian diinkubasikan kembali selama 30 menit pada suhu 37 °C. Sebanyak 1,5 ml larutan AMM (asam sulfat 5 N, aseton dan larutan ammonium molibdat 10 mM dengan perbandingan 1:1:2) ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Selanjutnya ditambahkan 100 μ l 1 M asam sitrat sebagai penstabil reaksi enzim fosfatase. Sampel di sentrifius dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Larutan kontrol dibuat dengan cara yang sama, tetapi penambahan enzim tidak dilakukan sebelum inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Penambahan enzim dilakukan bersamaan dengan penambahan larutan AMM dan asam sitrat, sebelum larutan disentrifius. Sebagai standar P digunakan KH_2PO_4 0,1 g/50 ml H_2O . Aktivitas enzim

fosfatase dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm terhadap warna kuning yang terbentuk.

Produksi Asam Indol Asetat (IAA) oleh Isolat Rizobakteri. Isolat *Pseudomonas* spp. ditumbuhkan selama 24 jam dalam medium King's B cair, sedangkan *Bacillus* spp. dalam larutan Nutrient Broth (Schaad *et al.*, 2001). Sintesis auksin dipacu dengan cara menambahkan asam amino triptofan 0,5 g/l ke dalam media. Biakan kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan dipisahkan dari endapan bakteri, disaring dengan membran nitroselulosa berporositas 0,2 μm , dan dianalisis kandungan IAA-nya. Kandungan IAA dalam filtrat kultur bakteri dideteksi dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 12 g/l dalam 7,9 M H_2SO_4 . Pereaksi FeCl_3 (1 ml) dan filtrat kultur bakteri (1 ml) ditambahkan ke dalam tabung *ependorf* (volume 2 ml), dan campuran diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu 25 $^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Setelah periode inkubasi, nilai absorbansi campuran dibaca dengan spektrofotometer (model Novaspec II) pada panjang gelombang 550 nm. Kurva standar berdasarkan nilai absorbansi larutan IAA murni dengan konsentrasi 0, 6,25, 12,5, 25,5, 75, 100, 150, dan 200 $\mu\text{g/ml}$ digunakan untuk menghitung kandungan IAA dalam filtrat kultur bakteri (Glickman & Dessaux, 1995).

Aktivitas Enzim Peroksidase. Aktifitas peroksidase diukur dengan cara menggerus 1 g daun bibit padi (umur 21 hari setelah tanam) dalam 0,1 M bufer fosfat pH 6,5 pada suhu 4 $^\circ\text{C}$. Homogenat disaring dengan kain kasa halus dan filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4 $^\circ\text{C}$ selama 20 menit. Supernatan disiapkan sebagai sumber enzim pada kuvet sampel spektrofotometer. Sebanyak 1,5 ml dari 0,05 M pyrogallol dan 100 μl ekstrak enzim dimasukkan ke dalam kuvet. Reaksi dimulai dengan menambahkan 100 μl 1% H_2O_2 ke dalam kuvet sampel dan diamati setiap 30 detik

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm (Vidhyasekaran *et al.*, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji daya hambat Xoo, Produksi Senyawa HCN, dan Siderofor. Berdasarkan hasil pengujian isolat dalam menghambat pertumbuhan Xoo menunjukkan bahwa keempat isolat yaitu *P. diminuta* A6, isolat *P. aeruginosa* A54, isolat *B. subtilis* 11/C, dan isolat *B. subtilis* 5/B mampu menghambat pertumbuhan Xoo. Hal ini dapat dilihat dari zona bening yang terbentuk disekitar isolat (Tabel 1, Gambar 1). Kemampuan menghambat pertumbuhan patogen ini berkaitan dengan kemampuan agens hayati menghasilkan HCN dan siderofor.

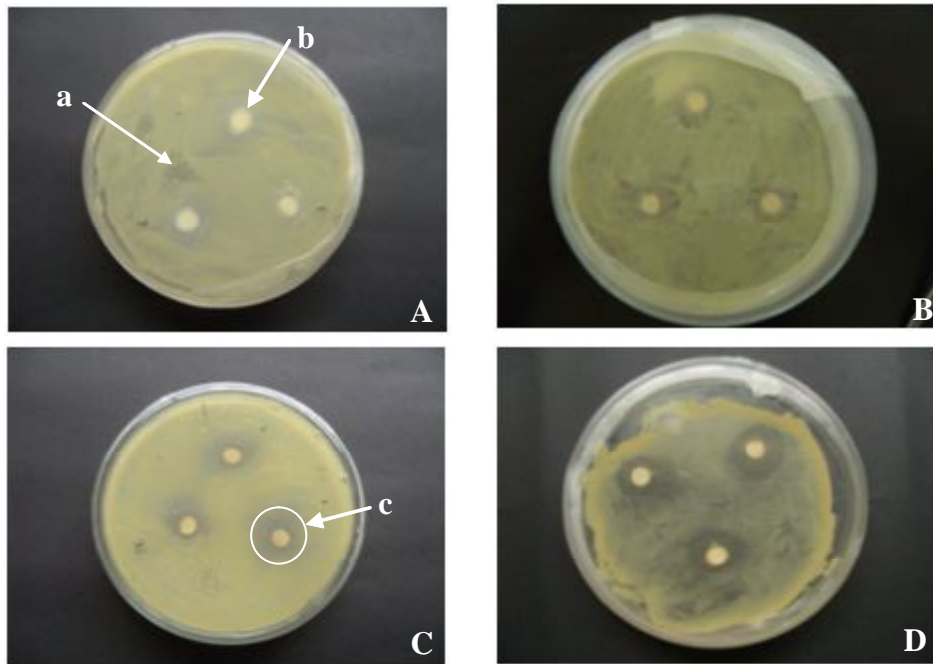
Hasil pengujian isolat dalam menghasilkan HCN, hanya isolat *P. diminuta* A6 saja yang memproduksi senyawa HCN (Gambar 2). Semua isolat rizobakteri yang diuji menghasilkan senyawa siderofor dan dari pembacaan nilai absorbansi dengan panjang gelombang 550 nm, isolat *B. subtilis* 5/B menghasilkan aktifitas siderofor tertinggi, diikuti isolat *P. aeruginosa* A54, isolat *P. diminuta* A6, dan isolat *B. subtilis* 11/C (Gambar 3). Menurut Fuente *et al.* (2004), senyawa HCN merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* spp. dan bersifat antimikroba. Sebelumnya Rayder *et al.* (1994) menyatakan bahwa kemampuan isolat bakteri menghasilkan HCN ditentukan juga oleh ketersediaan Fe.

Siderofor adalah senyawa pengkelat besi dalam kondisi kekurangan Fe yang disekresikan oleh mikroorganisme (Dwivedi & Johri 2003) dan siderofor paling banyak mengandung grup hydroxamate dan catechol yang berfungsi mengkelat Fe (Siddiqui, 2005). Peningkatan jumlah mikroba penghasil siderofor pada rizosfer tanaman famili *Graminae* (rerumputan) berhubungan dengan meningkatnya kemampuan penekanan penyakit (Crowley, 2001). Produksi siderofor oleh rizobakteri merupakan salah satu karakter dan

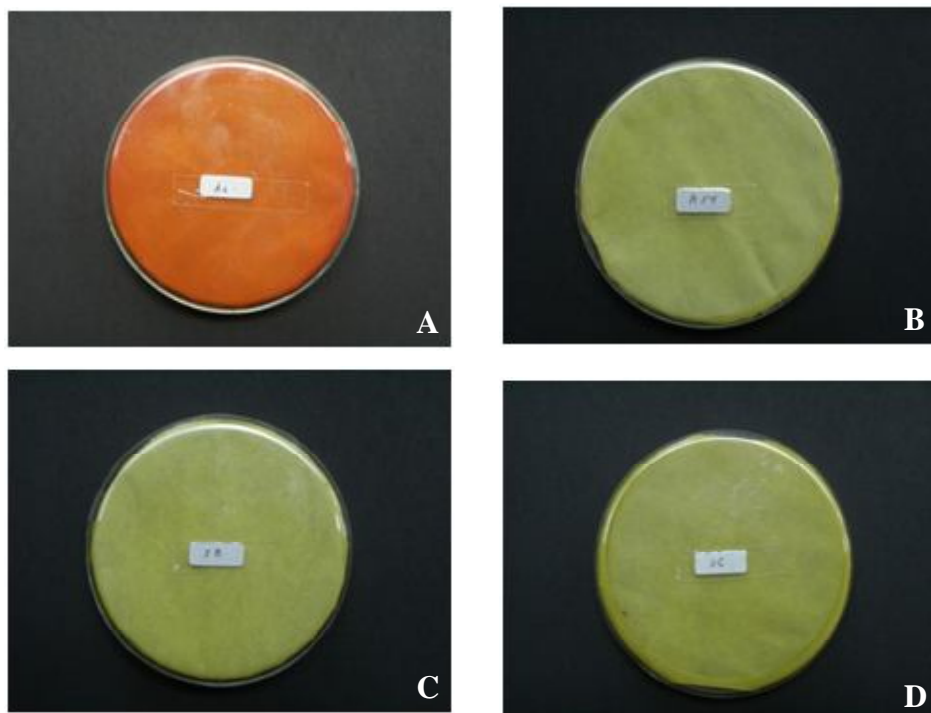
Tabel 1. Hasil identifikasi dan uji nilai tengah zona hambat empat isolat rizobakteri

Kode isolat	Rizobakteri	Diameter zona hambat (cm)
A6	<i>Pseudomonas diminuta</i>	2,02 a
11/C	<i>Bacillus subtilis</i>	1,22 bc
5/B	<i>Bacillus subtilis</i>	1,08 cd
A54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,43 b

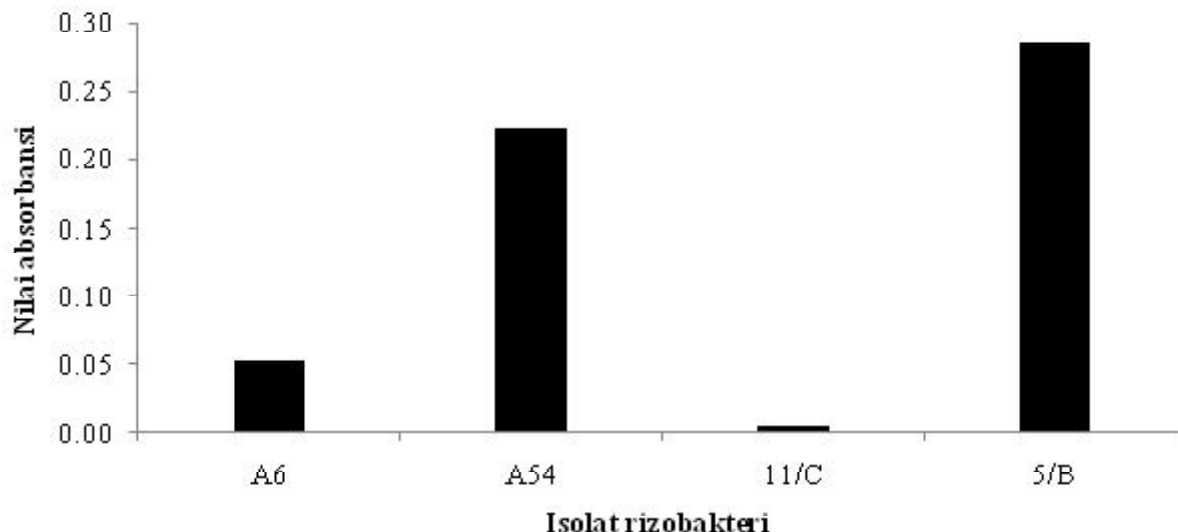
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada α 5%.



Gambar 1. Hasil uji daya hambat rizobakteri. (A) isolat *B.subtilis* 11/C, (B) isolat *B.subtilis* 5/B, (C) isolat *P. diminuta* A6, dan (D) isolat *P. aeruginosa* A54. Tanda panah: (a) bakteri Xoo, (b) kertas saring pembawa rizobakteri, dan (c) zona hambat terhadap pertumbuhan Xoo.



Gambar 2. Produksi HCN oleh isolat *P. diminuta* A6 pada media Glisina. (A) *P. diminuta* A6, (B) *P. aeruginosa* A54, (C) *B. subtilis* 5/B, dan (D) *B.subtilis* 11/C. Warna kertas saring merah bata mengindikasikan HCN diproduksi oleh rizobakteri dan kertas saring berwarna kuning mengindikasikan HCN tidak diproduksi oleh rizobakteri.



Gambar 3. Kemampuan isolat agen hayati menghasilkan senyawa siderofor. Aktivitas siderofor secara kualitatif ditentukan berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang (λ) 550 nm. A6 = *P. diminuta*; A54 = *P. aeruginosa*; 11/C = *B. subtilis*; 5/B = *B. subtilis*.

mekanisme dalam menekan pertumbuhan patogen. Menurut Kazempour (2004), mekanisme rizobakteri sebagai antagonis patogen dilakukan melalui kompetisi terhadap hara Fe yang juga digunakan untuk pertumbuhan mikroba lainnya. Mulya *et al.* (1996) menyatakan bahwa rizobakteri yang menghasilkan siderofor dan antibiotika lebih efektif menekan penyakit dibandingkan dengan rizobakteri yang menghasilkan siderofor atau antibiotik saja.

Kemampuan Melarutkan Fosfat dan Aktifitas Enzim Fosfatase. Semua isolat rizobakteri yang diuji mampu melarutkan fosfat. Kedua kelompok rizobakteri yaitu *Pseudomonas* spp. dan *Bacillus* spp. pada media uji Pikovskaya yang ditambahkan *tri-calcium phosphate* (TCP) sebagai sumber fosfat menghasilkan halo di sekitar pada media uji. Khan *et al.* (2009) menyatakan bahwa bakteri *Pseudomonas* spp. dan *Bacillus* spp. merupakan bakteri yang efektif dalam memperbaiki ketersediaan fosfat di dalam tanah. Terbentuknya halo tersebut menunjukkan kemampuan rizobakteri melarutkan fosfat. Selain itu, hasil pengujian aktifitas enzim fosfatase menunjukkan adanya aktifitas enzim fosfatase pada rizobakteri yang diuji (Tabel 2; Gambar 4). Menurut Rodriguez *et al.* (2004), rizobakteri pelarut fosfat dapat merubah fosfat tidak larut dalam tanah menjadi bentuk yang terlarut dan tersedia bagi tanaman. Halder *et al.* (1990) menjelaskan bahwa kemampuan rizobakteri melarutkan kompleks Kalsium fosfat (Ca-P) berkaitan dengan kemampuannya mereduksi pH di sekitarnya dan produksi asam organik

atau proton. Asam organik akan secara langsung melarutkan mineral fosfat hasil perubahan anion PO_4^{2-} oleh anion asam atau dengan mengikat ion Fe dan Al yang berasosiasi dengan fosfat. Richardson *et al.* (2011) menjelaskan asam organik yang dihasilkan oleh mikroba tanah melepaskan mineral fosfat yang terikat dengan Al, Fe, dan Ca.

Produksi Asam Indol Asetat. Hasil percobaan menunjukkan keempat isolat rizobakteri yang diuji memproduksi asam indol asetat (IAA) saat ditumbuhkan dalam media yang ditambahkan dengan asam amino triptofan. Isolat *B. subtilis* 5/B memproduksi IAA tertinggi yaitu 22.10 $\mu\text{g/ml}$. Produksi IAA terendah dihasilkan oleh isolat *P. aeruginosa* A54 yaitu 2.95 $\mu\text{g/ml}$. Hasil analisis produksi IAA oleh masing-masing rizobakteri disajikan pada Tabel 3. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian terdahulu bahwa isolat *Pseudomonas* spp. (Khalid *et al.*, 2005; Karnwal, 2009) dan *Bacillus* spp. (Khalid *et al.*, 2005) mampu menghasilkan IAA. Kemampuan rizobakteri menghasilkan IAA ditentukan oleh jumlah asam amino triptofan yang tersedia diperakaran tanaman yang dapat disintesis oleh rizobakteri. Hal ini disebabkan asam amino triptofan merupakan substrat utama pembentukan IAA. Menurut Thakuria *et al.* (2004) dan Karnwal (2009), kemampuan menghasilkan IAA ditentukan oleh jenis rizobakteri yang diuji dan kemampuan mengkolonisasi akar tanaman. Kemampuan rizobakteri mengkolonisasi perakaran tanaman berimplikasi pada jumlah asam amino triptofan yang diperoleh dari eksudat akar

Tabel 2. Pembentukan halo dan aktivitas enzim fosfatase oleh empat isolat rizobakteri pada medium Pikovskaya.

Rizobakteri	Halo	Aktivitas enzim fosfatase (unit/ml)
<i>P. diminuta</i> A6	+	2,25
<i>P. aeruginosa</i> A54	+	5,71
<i>B. subtilis</i> 11/C	+	1,39
<i>B. subtilis</i> 5/B	+	2,78

tanda + berarti terdapat halo dan mampu melarutkan fosfat.



Gambar 4. Kemampuan rizobakteri melarutkan fosfat. (1) *P. diminuta* A6, (2) *P. aeruginosa* A54, (3) *B. subtilis* 11/C, dan (4) *B. subtilis* isolat 5/B. Tanda panah (a) menunjukkan zona bening pelarutan fosfat medium *Pikovskaya*, (b) sumur tempat rizobakteri ditempatkan.

Tabel 3. Konsentrasi IAA yang dihasilkan empat isolat rizobakteri pada media yang mengandung asam amino triptofan.

Rizobakteri	Konsentrasi IAA ($\mu\text{g/ml}$)
<i>P. diminuta</i> A6	8,68
<i>P. aeruginosa</i> A54	2,95
<i>B. subtilis</i> 11/C	19,05
<i>B. subtilis</i> 5/B	22,10

tanaman. Produksi IAA oleh rizobakteri hanya akan terjadi jika konsentrasi asam amino triptofan di daerah perakaran tanaman cukup tinggi (Karnval, 2009).

Aktivitas Enzim Peroksidase. Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa tanaman yang diberi perlakuan rizobakteri memiliki aktivitas enzim peroksidase lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif kecuali pada perlakuan dengan isolat *B. subtilis* A54. Produksi enzim peroksidase tertinggi didapat pada kontrol positif (tanaman diinokulasi Xoo dan tidak diinokulasi agens hayati), diikuti perlakuan tanaman diinokulasi Xoo dan diinokulasi isolat *B. subtilis* 5/B, dan tanaman diinokulasi Xoo dan diinokulasi isolat *P. diminuta* A6. Keempat jenis agens hayati yang digunakan dalam percobaan ini mampu menginduksi ketahanan tanaman terhadap HDB

secara sistemik. Hal ini dapat dilihat dari kandungan enzim peroksidase yang dihasilkan pada tanaman yang diuji. Menurut Van Loon (2007) sejumlah enzim bertalian dengan induksi ketahanan sistemik, seperti peroksidase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), lipoxygenase, β -1.3 glucanase, dan chitinase. Enzim-enzim tersebut dikenal dengan kelompok PR-protein (*Pathogenesis-related protein*). Menurut Van Loon *et al.* (1998), akumulasi pembentukan PR-protein merupakan indikator resistensi secara sistemik. Peningkatan enzim peroksidase dan enzim lain yang bersifat antimikroba diatur oleh keberadaan asam jasmonat dan etilen yang keduanya diaktifkan oleh mikroba yang bersifat saprofit seperti rizobakteri. Chen *et al.* (2000) menjelaskan bahwa salah satu enzim yang berperan dalam meningkatkan resistensi tanaman terhadap serangan

Tabel 4. Kandungan enzim peroksidase (U/mg protein) pada tanaman padi yang diinokulasi dengan Xoo dan mendapat perlakuan rizobakteri.

Perlakuan benih	Aktivitas peroksidase (unit/mg protein)
Kontrol negatif	1,05 x 10 ⁻³
Kontrol positif	1,80 x 10 ⁻³
Diinokulasi Xoo dan diinokulasi isolat <i>P. diminuta</i> A6	1,20 x 10 ⁻³
Diinokulasi Xoo dan diinokulasi isolat <i>P. aeruginosa</i> A54	1,05 x 10 ⁻³
Diinokulasi Xoo dan diinokulasi isolat <i>B. subtilis</i> 11/C	1,15 x 10 ⁻³
Diinokulasi Xoo dan diinokulasi isolat <i>B. subtilis</i> 5/B	1,30 x 10 ⁻³

patogen adalah peroksidase. Peroksidase berperan sebagai pengkatalisis reaksi akhir dalam pembentukan lignin dan fenol lain yang berhubungan dengan pembentukan pertahanan untuk penguatan dinding sel.

SIMPULAN

Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat *P. diminuta* A6, *P. aeruginosa* A54, *B. subtilis* 11/C, dan *B. subtilis* 5/B memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan Xoo. Keempat isolat menghasilkan senyawa siderofor dengan aktivitas tertinggi pada isolat *B. subtilis* 5/B diikuti isolat *P. aeruginosa* A54, *P. diminuta* A6, dan *B. subtilis* 11/C. Hanya isolat *P. diminuta* A6 yang memproduksi senyawa HCN. Keempat isolat memproduksi IAA, enzim fosfatase, melarutkan fosfat, dan memiliki kandungan enzim peroksidase. Besarnya kandungan IAA adalah isolat *B. subtilis* 5/B (22,10 µg/ml), *B. subtilis* 11/C (19,05 µg/ml), *P. diminuta* A6 (8,68 µg/ml), dan isolat *P. aeruginosa* A54 (2,95 µg/ml). Kandungan enzim fosfatase masing-masing adalah *B. subtilis* 5/B (2,78 unit/ml), *B. subtilis* 11/C (5,7 unit/ml), *P. diminuta* A6 (2,25 unit/ml), dan *P. aeruginosa* A54 (5,71 unit/ml). Kandungan enzim peroksidase adalah isolat *B. subtilis* 5/B (1,30 x 10⁻³ unit/mg protein), *P. aeruginosa* A6 (1,20 x 10⁻³ unit/mg protein), *B. subtilis* 11/C (1,15 x 10⁻³ unit/mg protein), dan *P. aeruginosa* A54 (1,05 x 10⁻³ unit/mg protein).

SANWACANA

Terima kasih disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian, Kementerian Pertanian RI dan Direktorat Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah mendanai penelitian ini melalui Program KKP3T 2008 dan Program Hibah Bersaing Perguruan Tinggi 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal VK & Sinclair JB. 1996. *Principles of Seed Pathology*. New York: Lewis Publishers.
- Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque MA, Islam MZ, Shahidullah SM, & Meon S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African J. Biotechnol.* 8:1247-1252.
- Budiansyah A. 2010. Aplikasi cairan rumen sapi sebagai sumber enzim, asam amino, mineral, dan vitamin pada ransum broiler berbasis pakan lokal. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Chen C, Belanger RR, Benhamou N, & Paulitz TC. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Phytophthora aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 56:13-23.
- Crowley D. 2001. Fuction of siderophores in the plant rhizosphere. In: Pinton R, Varanini Z, & Nannipieri P. (Ed.). *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dirmawati SR. 2003. Kajian komponen pengendalian ramah lingkungan penyakit pustul bakteri kedelai [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Dwivedi D & Johri BN. 2003. Antifungals from fluorescens pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr Sci* 85:1693-1703.
- Faccini G, Garzon S, Martines M, & Varela A. 2004. Evaluation of the effects of a dual inoculum of phosphate-solubilizing bacteria and *Azotobacter chroococcum*, in creolo potato (Papa "Criolla")

- (*Solanum phureya*) var 'YemadeHuevo'. <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/faccini.pdf>. [17 Januari 2008].
- Fuente DL, Bajsa N, Bagnasco P, Quagliotto L, Thomashow L, & Arias A. 2004. Antibiotic production by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/delafuent.pdf>. [1 Februari 2010].
- Gnanamanickam SS, Brinda P, Narayanana NN, Vasudevan P, & Kavita S. 1999. An overview of bacterial blight diseases of rice and strategic for its management. *Curr. Sci.* 77 :1435- 1443.
- Glickman E & Dessaux Y. 1995. A critical examination of specificity of the salkowski reagent for indolic compound by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:793-796.
- Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D, Rahman M, Zafar Y, & Malik KA. 2006. Plant growth promoting bacteria as biofertilizer. *Agron. Sustain. Dev* 26:143-150.
- Halder AK, Misra AK, Bhattacharyya P, & Chakrabarty PK. 1990. Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36:81-92.
- Herman MAB, Nault BA, & Smart CD. 2008. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protec.* 27: 996-1002.
- Ilyas S, Sudarsono US, Nugraha TS, Kadir AM, & Yukti, YF. 2007. Teknik Peningkatan Kesehatan dan Mutu Benih Padi. Laporan Hasil Penelitian KKP3T. Kerjasama Institut Pertanian Bogor dan Balai Besar Penelitian Padi.
- Ji HG, Wei LF, He YQ, Wu YP, & Bai XH. 2008. Biological of rice bacterial blight by *Lysobacter* antibiotic strain 13-1. *Biol. Control* 45:288-289.
- Joo GJ, Kim YM, Kim JT, Rhee IK, Kim JH, & Lee IJ. 2005. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *J. Microbiol.* 43:510-515.
- Karnwal A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* 91:61-63.
- Kazempour MN. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in green house and field conditions. *J. Plant Pathol.* 3:88-96.
- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS, & Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1: 48-58.
- Khalid A, Tahir S, Arshad M, & Zahir ZA. 2005. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soil [abstract]. *Aus. J. Soil. Res.* 42:921-926. <http://www.publish.csiro.au/nid/84/paper/SR4019.htm>. [5 Februari 2010].
- Mehrvaz S & Chaichi MR. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on forage and grain quality of barley. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 3(6):855-860.
- Minorsky PV. 2008. Pyrroloquinoline Quinone: A New Plant Growth Promotion Factor. *Plant Physiol.* 146: 323–324.
- Mulya K, Watanabe M, Goto M, Takikawa Y, & Tsuyusumu S. 1996. Suppression of bacterial wilt disease in tomato by root dipping with *Pseudomonas fluorescens* PfG32: The role of antibiotic substances and siderophore production. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 62:132-140.
- Munif A. 2001. Studies on the importance of endophytic bacteria for biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato [Dissertation]. Bonn, Germany: Institute for Plant Diseases, University of Bonn.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, & Sa T. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crop of Korea. *Micro. Res.* 160:127-133.
- Rao NSS. 2007. *Mikroorganisme dan Pertumbuhan Tanaman*. Jakarta: UI Press.
- Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, & Bahsan Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* spp. *Naturewissenschaften* 91:552-555.

- Rayder MH, Stephens PM, & Bowen GD. 1994. Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Proc. Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Adelaide, South Australia, March 7-11, 1994.
- Schaad NW, Jones JB, & Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota: APS Press.
- Siddiqui ZA. 2005. *PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens*. Netherlands: Springer.
- Thakuria D, Talukdar NC, Goswami C, Hazarika S, Boro RC, & Khan MR. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere in rice grown in acidic soil from Assam. *Curr. Sci.* 86:978-985.
- Van Loon LC. 2007. Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol* 119:243-254.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, & Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
- Veena MS, Khrisnappa, Shetty HS, Mortensen CN, & Mathur SB. 1996. Seed borne nature transmission of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathogenic Bacteria*: 420-429.
- Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, & Thomashow L. 2006. Biological control of bacterial blight by plant associated bacteria producing 2,4 diacetylphloroglucinol. *Canad. J. Microbiol.* 52:56-65.
- Vidhyasekaran P, Kamala N, Ramanathan A, Rajjappan K, Paranidharma V, Velazhahan R. 2001. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pfl against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice leaves. *Phytoparasitica* 29:155-166.
- Vikal Y, Das A, Patra B, Goel RK, Sidhu JS, & Singh K. 2007. Identification of news sources of bacterial blight resistance in wild oryza species. *Plant Genetic Resources* 5:108-112.