

# KAJIAN PEMANFAATAN LIMBAH ORGANIK CAIR UNTUK PEMBIAKAN MASAL AGENS ANTAGONIS *PSEUDOMONAS FLOURESCENS* SERTA UJI POTENSINYA SEBAGAI BIO-PESTISIDA

(STUDY OF LIQUID ORGANIC WASTES AS MASS PRODUCTION MEDIA FOR  
ANTAGONISTIC AGENTS OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* AND POTENCY TEST AS  
BIO-PESTICIDE)

Giyanto<sup>1)</sup>, Efi Toding Tondok<sup>1)</sup>

## ABSTRACT

*Pseudomonas fluorescens* has been well known as biological control agent for plant diseases control. The problem to apply the agents widely in the field or in the level of farmer is limited technology of mass production with low cost, due to the simple technology of propagation has not been yet available. The objective of this research is to study the potency of liquid organic wastes as media for mass production of *P. fluorescens* and to formulate them as bio-pesticide. The results showed that modification of coconut water to pH of 7.0 could be used as media for growing *P. fluorescens*. The *P. fluorescens* also could grow well in livestock liquid waste by adding 10% meat extract. On the other hand, the liquid tofu waste and liquid compost waste became good media for growing of *P. fluorescens* by addition of 10% meat extract and 1.25% sugar. Tetes tebu will be very good media for *P. fluorescens* at 5% final concentration and by adding of 10% meat extract and 2.5% of sugar. The *P. fluorescens* showed high antagonistic effect to *Ralstonia solanacearum* and *Sclerotium rolfsii* in all of modified liquid organic wastes media. Survival and antagonistic activity of *P. fluorescens* in modified organic liquid wastes stored at 5°C or room temperature were 12 weeks. In vivo antagonistic and plant growth promoting activity showed that *P. fluorescens* grown in liquid organic waste suppressed the incidence of stem rot diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and increased the vigor of plant growth on watermelon. Formulation of the *P. fluorescens* grown in modified coconut water gave the best performance of *P. fluorescens* in suppressing of plant diseases and inducing plant growth. The product of BeMOR(e) (beneficial microorganism) from the result of this research will be proposed to be patented.

Keywords : *Pseudomonas fluorescens*, organic liquid waste, biological control

## ABSTRAK

*Pseudomonas fluorescens* merupakan bakteri agens pengendalian hayati yang banyak digunakan untuk pengendalian patogen tumbuhan. Namun demikian, prospek penggunaannya sebagai agen pengendalian hayati pada tataran aplikasi di lapangan dihadapkan pada kendala mahal biaya pembiakan masal yang disebabkan oleh belum tersedianya media murah untuk menggantikan medium standar laboratorium yang relatif mahal. Tujuan penelitian adalah mengkaji pembiakan *P. fluorescens* pada limbah organik cair dan menformulasikannya sebagai *bio-pestisida*. Hasil penelitian menunjukkan air kelapa sangat baik digunakan untuk pertumbuhan *P. fluorescens* dengan memodifikasi pH hingga mencapai pH 7. Limbah cair peternakan dengan modifikasi penambahan 10% ekstrak hewani dapat mendukung pertumbuhan *P. fluorescens* lebih baik dibandingkan pertumbuhan bakteri pada media tanpa modifikasi. Sementara itu limbah cair proses pembuatan tahu dan limbah sampah cair dapat memberikan pertumbuhan bakteri yang baik dengan penambahan 10% ekstrak hewani dan 1.25% gula pasir. Penggunaan 5% tetes tebu dengan penambahan 10% ekstrak hewani dan 2.5% gula pasir juga sangat baik bagi pertumbuhan *P. fluorescens*. Uji in vitro menunjukkan bahwa *P. fluorescens* yang ditumbuhkan pada limbah-limbah organik tersebut di atas memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan *Ralstonia solanacearum* dan *Sclerotium rolfsii*. *P. fluorescens* menunjukkan ekspresi senyawa *phloroglucinol* dengan teknik hibridisasi *northern*. Daya tahan bakteri pada penyimpanan suhu ruang maupun suhu dingin (4°C) berkisar sekitar 12 minggu dengan tingkat efektifitas dan juga populasi bakteri yang masih tinggi. Uji in vivo menunjukkan adanya efektivitas penekanan penyakit busuk pangkal batang oleh *Sclerotium rolfsii* pada tanaman semangka serta peningkatan pertumbuhan atau vigoritas tanaman pada perlakuan dengan *P. fluorescens* yang dibiakkan pada limbah cair maupun media standar. Hasil penelitian ini telah berhasil

<sup>1)</sup>Dep. Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

diformulasikan bakteri *P. fluorescens* yang dibiakkan pada limbah air kelapa yang telah dimodifikasi. Nama produk adalah Be-MOR(e) (*beneficial microorganism*) yang akan disempurnakan lebih lanjut untuk kemudian dipatenkan sebagai penemuan dari penelitian ini.

**Kata kunci :** *Pseudomonas fluorescens*, limbah organik cair, agens pengendalian hayati.

## PENDAHULUAN

Laporan penelitian mengenai potensi *Pseudomonas fluorescens* sebagai agens pengendalian hayati patogen tumbuhan telah banyak diterbitkan. Biasanya laporan tersebut mencakup isolasi *Pseudomonas fluorescens* dari berbagai macam material tanaman pada daerah *rhizosphere* (perakaran) maupun *phylosphere* (bagian daun) serta dari berbagai jenis tanah. Isolat hasil isolasi tersebut kemudian ditumbuhkan pada media standar laboratorium, kemudian diaplikasikan dalam bentuk perlakuan benih, bibit, ataupun penyemprotan suspensi *Pseudomonas fluorescens* pada jaringan tanaman lainya untuk kemudian dibandingkan intensitas penyakitnya terhadap tanaman kontrol tanpa penggunaan *Pseudomonas fluorescens* (Loper, 1988).

*Pseudomonas fluorescens* merupakan agens antagonis yang mampu menekan perkembangan berbagai macam patogen tumbuhan. *Pseudomonas fluorescens* strain 5 (Pf-5) merupakan bakteri *Pseudomonas fluorescens* pertama yang dilaporkan mampu menekan penyakit layu pada kapas yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* (Howell and Stipanovic, 1979) dan *Pythium ultimum* (Howell and Stipanovic, 1980). Aplikasi *Pseudomonas fluorescens* pada rumput lapangan golf mampu menekan perkembangan penyakit "dollar spot" yang disebabkan oleh *Sclerotinia homoeocarpa* dan bercak daun yang disebabkan oleh *Dreschlera poae*, dua penyakit utama yang sangat merusak dan mempunyai daerah sebaran yang luas pada rumput golf dan pertamanan (Rodriguez and Pfender, 1997). Pada pertanaman tomat aplikasi Pf-5 mampu menekan busuk akar yang disebabkan oleh *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998). Sementara itu aktivitas antagonis terhadap bakteri patogen tumbuhan dilaporkan bahwa aplikasi *Pseudomonas fluorescens* mampu menekan penyakit busuk umbi pada bibit kentang yang disebabkan oleh *Erwinia carotovora* (Xu and Gross, 1986). Hasil uji *in vitro* *Pseudomonas fluorescens* menunjukkan adanya senyawa antibiosis yang mampu menekan perkembangan bakteri penyebab layu pada tomat, *Ralstonia solanacearum* (Giyanto *et al.*, 1998).

Keterbatasan ketersediaan paket teknologi untuk pembiakan masal yang murah merupakan

kendala utama penggunaan *Pseudomonas fluorescens* untuk pengendalian penyakit tanaman di lapangan. *Pseudomonas fluorescens* dikenal luas sebagai bakteri saprofitik yang mampu bertahan dan berkembang pada sisa-sisa bahan organik. Sementara itu limbah organik cair tersedia melimpah di masyarakat belum digunakan secara optimal dan bahkan cenderung menjadi masalah pencemaran lingkungan. Dengan latar belakang tersebut di atas penulis menganggap perlu melakukan penelitian dasar tentang kemungkinan pembiakan agens antagonis pada berbagai medium alternatif khususnya bahan limbah organik cair yang tersedia di masyarakat untuk digunakan sebagai media pembiakan masal agen antagonis. Penelitian difokuskan pada upaya penggunaan limbah organik cair dengan berbagai modifikasinya untuk pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens*. Ranah penelitian mencakup: pola pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* pada berbagai media limbah organik termodifikasi, studi ekspresi gen-gen penyandi senyawa antibiosis, dan uji efektivitas penekanan perkembangan bakteri maupun cendawan patogen baik *in vitro* maupun *in vivo*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan formula penggunaan limbah cair organik (limbah cair proses pembuatan tahu, tetes tebu, air kelapa, limbah cair peternakan dan limbah cair pada tempat pembuangan akhir (TPA) sampah kota) sebagai media biakan alternatif untuk pembiakan masal *P. fluorescens* yang dapat digunakan sebagai bio-pestisida untuk mendukung pertanian ramah lingkungan.

## BAHAN DAN METODE

### Pembiakan *Pseudomonas fluorescens* dari Stok Kultur Laboratorium

*Pseudomonas fluorescens* agens pengendalian hayati yang akan digunakan merupakan kultur stok yang dimiliki laboratorium Bakteriologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian IPB sebagai hasil penelitian sebelumnya (Giyanto *et al.*, 1998). *Pseudomonas fluorescens* dibiakkan pada medium King's B Agar (Protease peptone 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g, Glycerol 15 ml,

Agar 15 g dan aquabidest 1 liter) dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam. Kemurnian isolat bakteri ditandai dengan koloni dengan pigmen hijau kekuningan selanjutnya akan digunakan pada uji selanjutnya.

### **Penggunaan Limbah Organik Cair sebagai Media Biakan *Pseudomonas fluorescens***

Limbah organik yang digunakan berupa: limbah cair proses pembuatan tahu, tetes tebu, air kelapa, limbah cair peternakan dan limbah cair pada tempat pembuangan akhir (TPA) sampah kota. Ekstrak protein hewani menggunakan bahan limbah pemotongan hewan (usus ayam potong). Ekstrak hewani dibuat dengan cara membuat kaldu usus ayam dengan merebus 5 gram usus ayam pada 100 ml aquadest selama 10 menit. Kaldu yang didapatkan kemudian disaring dan siap digunakan untuk modifikasi limbah organik cair. Limbah organik yang telah mengandung ekstrak hewani kemudian ditambah gula pasir pada berbagai macam konsentrasi gula sebagai sumber karbon, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf dan siap digunakan sebagai medium biakan untuk pembiakan *Pseudomonas fluorescens*. Sebanyak 100 ml media yang telah disiapkan, diinokulasi dengan kultur bakteri agens pengendalian hayati (100:1) yang ditumbuhkan semalaman pada medium Luria Broth (10 g casein, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, pH 7.2). Media biakan yang telah diinokulasi dengan *Pseudomonas fluorescens* ditumbuhkan pada inkubator bergoyang (*shaker*) 150 rpm pada suhu 30°C. Populasi bakteri pada berbagai macam kondisi pertumbuhan limbah organik dihitung dengan metode pencawanan dan selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

### **Analisis Transkripsi Gen Penyandi Senyawa Antibiosis dengan *Northern Blot***

*Pseudomonas fluorescens* ditumbuhkan dalam 100 ml medium uji (limbah organik cair dengan berbagai modifikasi) dan medium Luria Broth sebagai kontrol dan dipanen pada fase awal (*lag phase*), fase logaritmik (*log phase*) serta fase stasioner (*stationare phase*) dari pertumbuhan bakteri. Sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi dan total RNA diekstraksi dari sel bakteri seperti metode yang telah dilaporkan (Igo and Losick, 1986). Sel bakteri disuspensikan pada 0.55 ml bufer LETS (100 mM LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 dan 1% SDS), 0.5 ml *glass bead* (0.7 mm) dan 0.5 ml *phenol-chloroform-isoamyl alcohol* (24:1:1), kemudian

divortex pada kecepatan maximum selama 4 menit. Sisa sisa sel dan *glass bead* dipisahkan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Sebanyak 15 ul 4M LiCl ditambahkan ke dalam supernatan, kemudian RNA dipresipitaskan dengan penambahan ethanol sebanyak 2.5 X volume supernatan dan disentrifugasi 14.000 rpm selama 15 menit. Pelet RNA dicuci 2 kali dengan 70% etanol dan dikeringkan pada suhu ruang selama 20 menit. RNA disuspensikan dalam 50 µl H<sub>2</sub>O sterill yang bebas RNase.

Sebanyak 5 µg RNA dielektroporesiskan pada 1% formaldehyde-agarose dan RNA dipindahkan pada membran nilon (Hybon N<sup>+</sup>, Amersham Pharmachia) dengan *blotting* seperti prosedur yang diuraikan oleh Sambrook *et al.*, (1989). RNA probe dilabel dengan Digoxigenin dan disintesa *in vitro* dengan T7 RNA polymerase. Sementara itu template DNA dihasilkan dengan PCR menggunakan primer yang berkorelasi dengan amplifikasi gen *phzC* dan *pltM* (PhzC-F: 5'-CGG TTC GAC CCA CTG GCC GTG -3', PhzC-R: 5'-GTC GTC CGG GGT GGT TTC CAG GTG; PltM-F: 5'-GGT TCG AGC GCC TGC GGG-3', dan PltM-R: 5'-CCC CCT GGA GAA CAG CGG GTC-3') yang mengandung promotor T7 RNA polymerase. Penyusunan sequen primer didasarkan pada data DNA sekuen dari gen-gen tersebut di atas yang bisa diakses dari GenBank. Hybridisasi dilakukan pada suhu 68°C semalaman menggunakan probe RNA yang telah dilabel sebanyak 10 ng sesuai dengan pedoman penggunaan yang disusun oleh produsen (Boehringer Mannheim). Sinyal pada membran hasil hibridisasi selanjutnya diproses dengan menggunakan CSPD reagent kit (Roche) dan deteksi sinyal menggunakan film X-ray. Visualisasi purifikasi RNA dan DNA fragmen hasil PCR menggunakan ethidium bromide yang dipaparkan pada mesin UV-transluminator serta didokumentasikan dengan foto. Sedangkan visualisasi hasil hibridisasi northern dilakukan dengan teknik *development* menggunakan larutan *fixation* dan *developer* pada ruang gelap.

### **Uji *in vitro* Potensi Antagonistik *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Ralstonia solanacearum* dan *Fusarium oxysporum f. sp. niveum***

*P. fluorescens* ditumbuhkan pada limbah organik cair (pH medium dibuat pada kondisi netral dengan larutan KOH atau HCL) dengan modifikasinya dalam erlenmeyer 500 ml yang berisi 100 ml medium. Selanjutnya erlenmeyer tersebut diinkubasikan pada suhu 30°C dan digoyang-goyangkan secara terus menerus menggunakan

*shaker* (150 rpm). Dari fase pertumbuhan bakteri dimana ekspresi gen pengkode senyawa antibiotik tinggi dilakukan pengujian potensi antagonisme *in vitro*.

Uji potensi antagonistik *P. fluorescens* yang dibiakkan pada berbagai media limbah cair organik terhadap penekanan pertumbuhan bakteri patogen tuumbuhan *Ralstonia solanacearum* di lakukan dengan teknik *paper disc assay*. *R. solanacearum* ditumbuhkan hingga kepadatan populasi  $10^6$  sel/ml pada media LB. Sebanyak 50 ul suspensi bakteri tersebut disebar pada media Nutrient Agar (NA) hingga merata, dan kemudian dikeringanginkan hingga air yang ada di permukaan agar kering. Potongan kertas saring steril berbentuk bulatan dengan diameter 5 mm diletakkan di atas media agar yang telah disebar *R. solanacearum*, kemudian 30  $\mu$ l suspensi *P. fluorescens* yang dibiakkan pada berbagai limbah cair organik diteteskan diatas kertas saring serta diinkubasikan pada suhu ruang. Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas saring kemudian diukur untuk menentukan potensi antagonistik dari *P. fluorescens*. Sebagai kontrol, kertas saring lain ditetesi dengan *P. fluorescens* yang dibiakkan pada media standar laboratorium atau media biakan tanpa *P. fluorescens*.

Uji potensi antagonis terhadap *F. oxysporum* f. sp *niveum* dilakukan dengan metode *dual culture*. Medium tumbuh yang digunakan adalah PDA (Potato Dextrose Agar). PDA yang telah ditumbuhkan *F. oxysporum* f.sp *niveum* yang berumur 3 hari pada cawan petri dilubangi dengan pelubang gabus. Dengan menggunakan lup inokulasi steril dipindahkan inokulum *F. oxysporum* berupa potongan bulat media PDA (diameter 0.5 cm) dan ditumbuhkan kembali pada media PDA lain yang baru. Pada sisi lain dari media PDA diletakkan kertas saring yang dipotong memanjang dengan ukuran 4 x 40 mm yang ditetesi dengan *P. fluorescens* yang ditumbuhkan pada berbagai media. Persentase penghambatan pertumbuhan *F. oxysporum* dapat dihitung dengan membandingkan jari-jari koloni pertumbuhan patogen yang menjauhi agens antagonis dengan jari-jari koloni pertumbuhan cendawan yang berhadapan dengan posisi agens antagonis.

### **Uji Daya Tahan *Pseudomonas fluorescens* pada Media Pertumbuhan Limbah Organik Cair**

Pengujian daya tahan *P. fluorescens* dilakukan terhadap komposisi limbah organik cair yang mampu mendukung pertumbuhan *P. fluorescens* serta memiliki efektifitas penekanan yang tinggi terhadap

patogen pada media Luria Broth sebagai media pembanding. Pada 500 ml erlenmeyer ditambahkan 100 ml media limbah organik dan ditumbuhkan bakteri *P. fluorescens* seperti pada metode yang diuraikan sebelumnya. Media hasil inkubasi tersebut selanjutnya disimpan pada suhu ruang atau suhu 4°C selama 3 bulan. Penghitungan populasi bakteri dilakukan pada setiap minggu menggunakan metode pencawan Pada media King`s B Agar. Uji potensi antagonistik terhadap bakteri dan cendawan patogen juga dilakukan setiap minggu selama masa penyimpanan untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap efektifitas penekanan patogen dari *Pseudomonas fluorescens* yang ditumbuhkan pada media limbah organik cair.

### **Uji Potensi Bio-pestisida *Pseudomonas fluorescens* Terhadap Penyakit Layu Bakteri pada Cabai dan Layu *Fusarium* pada Tanaman Semangka**

Media tumbuh tanaman cabai dan semangka berupa campuran tanah dan pupuk kandang (1:1) disterilisasi dengan autoklaf. Penambahan pupuk NPK disesuaikan dengan jenis tanaman uji (tomat/semangka). Perlakuan terdiri dari: (i) penumbuhan tanaman uji pada tanah steril tanpa perlakuan patogen maupun agens antagonis (*P. fluorescens*), (ii) penumbuhan tanaman tomat dengan perlakuan patogen (*R. solanacearum* atau *F. oxysporum* f.sp *niveum*), (iii) penumbuhan tanaman uji dengan penambahan agens antagonis, dan (iv) penumbuhan tanaman uji pada tanah yang ditambahkan patogen dan agens antagonis. Perlakuan agen antagonis adalah penyiraman tanah dengan suspensi *P. fluorescens* yang dibiakkan pada media limbah organik cair maupun media King`s Broth hingga dicapai konsentrasi agens antagonis pada tanah sebesar  $9 \times 10^6$  colony forming unit (CFU) per gram tanah kering dan kemudian dicampurkan hingga merata. Inokulasi patogen dilakukan dengan menambahkan inokulum pada campuran tanah hingga mencapai kerapatan  $10^5$  CFU per gram tanah kering pada *Ralstonia solanacearum* dan  $10^4$  konidia *Fusarium* per gram tanah kering. Campuran tanah tersebut selanjutnya dimasukkan dalam polibag masing masing 3 kg. Sementara itu bibit cabai dan semangka disiapkan terpisah hingga mencapai umur 3 minggu dan dipindahkan ke dalam polibag dengan kedalaman 2 cm.. Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 10 ulangan (tanaman). Parameter yang diamati adalah intensitas penyakit layu bakteri atau layu *Fusarium* dengan menghitung persentase

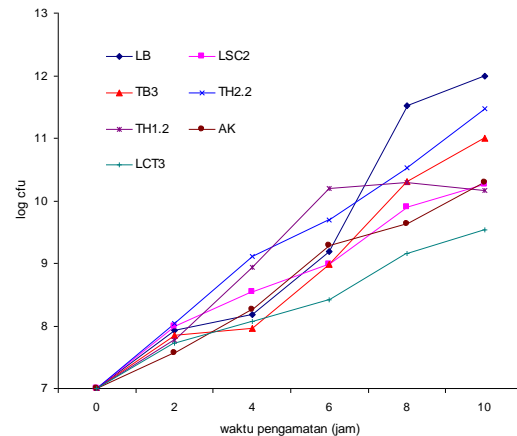
tanaman layu dari jumlah tanaman uji pada setiap perlakuan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penggunaan Limbah Cair Organik dan Modifikasinya Sebagai Media Biakan *Pseudomonas fluorescens*

Limbah cair organik yang digunakan dalam penelitian ini adalah air kelapa (AK), limbah cair peternakan (LCT), limbah tahu-1 (TH1) yaitu limbah tahu yang diperoleh dari hasil pengendapan hasil penggilingan kedelai dalam proses pembuatan tahu, limbah tahu-2 (TH2) yaitu limbah tahu cair yang merupakan campuran berbagai macam limbah cair lain yang dialirkan dari proses pembuatan tahu ke selokan/bak penampungan untuk selanjutnya dibuang ke sungai atau selokan, tetes tebu (TB) serta limbah sampah cair (LSC) dari tempat pembuangan sampah akhir. Limbah-limbah tersebut diambil dan disaring dengan kertas saring Watman no. 3, kemudian digunakan sebagai media pembiakan *Pseudomonas fluorescens* setelah pH disesuaikan menjadi 7 dengan penambahan HCl atau NaOH. Limbah-limbah tersebut kemudian tanpa atau dengan modifikasi dengan penambahan ekstrak protein hewani dan gula pasir dengan beberapa tingkat konsentrasi, kemudian dibandingkan dengan media standar laboratorium yaitu Luria Broth (LB).

Data-data pertumbuhan pada berbagai limbah cair organik menunjukkan adanya potensi penggunaan limbah tersebut sebagai media alternatif bagi pembiakan masal *Pseudomonas fluorescens*. Air kelapa adalah satu satunya limbah organik yang paling baik mendukung pertumbuhan *P. fluorescens* meskipun tanpa penambahan ekstrak protein hewani serta gula pasir. Hal ini dimungkinkan karena air kelapa merupakan media bagi pertumbuhan embrio kelapa yang sangat kaya dengan nutrisi. Vigliair *et al.*, 2006 melaporkan bahwa air kelapa memiliki kandungan nutrisi di dalamnya 4% karbohidrat, 0.1% lemak, 0.02% kalsium, 0.01% fosfor, 0.5% besi serta total protein (9 g/L), vitamin C, vitamin B kompleks dan garam-garam mineral. Limbah tahu, tetes tebu, limbah cair peternakan, limbah cair sampah juga memiliki potensi yang baik sebagai media pertumbuhan *P. fluorescens* dengan modifikasi berupa penambahan ekstrak protein hewani atau gula pasir. Gambar 1 menunjukkan pola pertumbuhan bakteri pada berbagai jenis limbah serta modifikasinya yang berpotensi digunakan sebagai media bagi pembiakan masal *P. fluorescens*



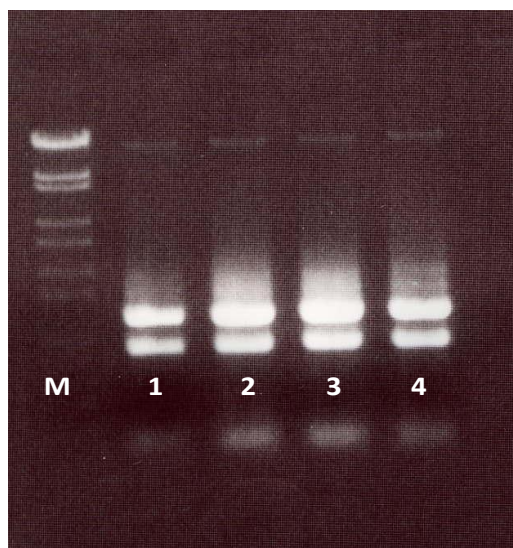
Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* pada berbagai limbah cair organik dan modifikasinya dengan pola pertumbuhan yang menyerupai pola pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* pada media standar (LB). LB: media luria broth; TB3: 5% tetes tebu dengan penambahan 10% ekstrak protein hewani dan 2.5% gula pasir; TH1.2: limbah tahu 1 dengan penambahan 10% ekstrak protein hewani dan 1.25% gula pasir; TH2.2: limbah tahu 2 dengan penambahan 10% ekstrak protein hewani dan 1.25% gula pasir; LSC2: limbah sampah cair dengan penambahan 10% ekstrak protein hewani dan 1.25% gula pasir; AK: air kelapa; LCT3: limbah cair peternakan dengan penambahan 10% ekstrak jprotein hewani dan 0% gula pasir. pH pada semua media disesuaikan menjadi pH 7.

### Deteksi Molekuler gen-gen penyandi Senyawa Phenazine dan Pyoluteurin oleh *Pseudomonas fluorescens* dengan Northern Hybridization

Penyusunan probe dilakukan untuk deteksi ekspresi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *P. fluorescens* dengan teknik hibridisasi northern blot. Dua senyawa metabolit yang ingin diketahui tingkat ekspresinya pada media alternatif adalah *phenazine* (yang dikodekan oleh gen *phz*) dan *pyoluteurin* (yang dikodekan oleh gen *plt*). Karena isolat *P. fluorescens* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat asli Indonesia yang belum pernah dikarakterisasi gen penyandi kedua senyawa metabolit tersebut di atas, maka penyusunan primer untuk amplifikasi gen-gen tersebut didasarkan hasil

deduksi pada daerah dengan susunan asam amino yang konservatif (*conserve region*) dari bakteri model yang telah diketahui sebelumnya yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 berdasarkan sekuen yang tersedia pada Genbank.

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi DNA kromosom *P. fluorescens* menggunakan Genomic DNA Mini Kit, amplifikasi gen penyandi senyawa metabolit sekunder dengan *polymerase chain reaction* (PCR), ekstraksi fragment teramplifikasi menggunakan Gel/PCR DNA Extraction Kit. Adapun labelisasi probe dengan digoxigenin (*Digoxigenin Labelling Kit*) dilakukan sesuai dengan prosedur yang tercantum dalam produk.

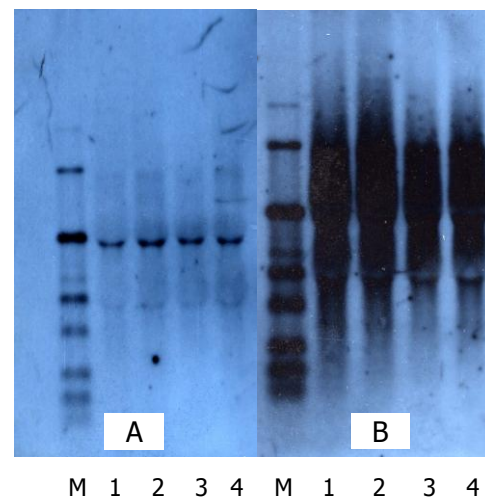


Gambar 2. Purifikasi RNA total *Pseudomonas fluorescens* pada berbagai fase pertumbuhan dalam media LB. (M: marker (DNA lambda yang dipotong dengan *Eco*T14 I), lane 1, 2, 3 dan 4: RNA total *P. fluorescens* yang ditupanen pada 2, 4, 6, dan 8 jam setelah inokulasi).

Purifikasi RNA merupakan tahapan yang agak sulit dilakukan mengingat harus ada kondisi khusus, terutama alat-alat dan bahan-bahan yang harus bebas dari RNase. Namun demikian setelah dilakukan optimasi akhirnya purifikasi RNA dapat dilakukan dengan baik. Hasil purifikasi total RNA dari *P. fluorescens* pada berbagai fase pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 2.

Setelah didapatkan RNA total, tahap selanjutnya adalah memisahkan RNA berdasarkan bobot molekul dengan teknik elektroforesis seperti

terlihat pada Gambar 2 dan selanjutnya RNA tersebut ditransfer pada membran nilon dengan teknik *blotting*. Untuk memperkuat ikatan RNA dengan membran nilon, maka dilakukan *fiksasi* dengan cara memasukkan membran nilon yang telah mengandung RNA pada oven dengan suhu 180°C selama 2 jam (teknik *baking*). Keberadaan RNA pada membran nilon juga dapat dilacak dengan pewarnaan menggunakan larutan *methylen blue* selama 15 menit dan kemudian dicuci dengan aquades sebanyak 3 – 5 kali. Deteksi ekspresi gen pengkode senyawa antibiosis *phenazine* dan *pyoluteorin* dilakukan dengan cara hibridisasi antara probe (pelacak) dengan RNA total yang telah ditransfer pada membran nilon. Hasil deteksi ekspresi gen pengkode senyawa *phenazine* tidak menunjukkan adanya sinyal yang jelas. Diduga strain bakteri *P. fluorescens* isolat Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini tidak mengandung gen pengkode senyawa *phenazine* atau tingkat ekspresi gen tersebut sangat rendah sehingga pelacakan ekspresi gen tersebut dengan probe yang telah disiapkan tidak memberikan hasil positif (Gambar 3A).



Gambar 3. Deteksi transkripsi gen pengkode senyawa *phenazine* (A) dan *pyoluteorin* (B) dengan hibridisasi northern pada *Pseudomonas fluorescens* pada berbagai fase pertumbuhan dalam media LB. M: RNA marker, lane 1, 2, 3 dan 4 ekspresi senyawa *pyoluteorin* (A) dan *phenazine* (B) *P. fluorescens* yang dipanen pada 2, 4, 6, dan 8 jam setelah inokulasi pada media LB.

Hasil hibridisasi dengan northern blot untuk mendeteksi ekspresi dan *pyoluteorin* menunjukkan sinyal yang kuat namun tidak spesifik seperti terlihat

pada Gambar 3B. Hal ini diduga ekspresi gen pengkode *pyoluteorin* pada *P. fluorescens* bersifat *polysitronic* (diekspresikan bersama sama dengan gen lain dalam satu kluster) sehingga ukuran RNA *messenger* sangat besar dan berinteraksi dengan RNA lain sehingga signal yang dihasilkan tidak bersifat terpisah secara jelas (Gambar 3B). Pada *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-5 yang telah berhasil diketahui keseluruhan sekuen dari genom utuhnya menunjukkan bahwa gen pengkode senyawa *pyoluteorin* berada bersama 15 gen-gen lain yang terlibat dalam sintesis senyawa tersebut dalam satu kluster (Paulsen *et al.*, 2005).

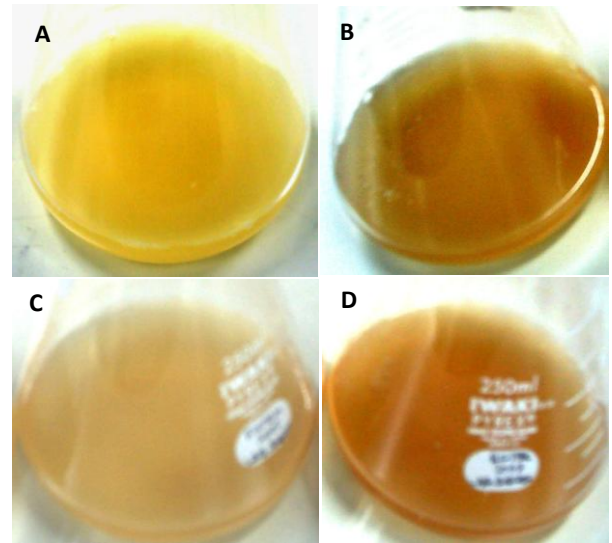
### Uji Potensi Antagonisme *in vitro* antara *Pseudomonas flourescens* dengan *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tomat

Pengujian potensi antagonisme *P. fluorescens* terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* dilakukan seluruh fase pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* yaitu fase *laging*, fase *logaritmik* dan fase *stationary* dari setiap limbah organik cair baik termodifikasi atau tanpa modifikasi yang memiliki pola pertumbuhan bakteri seperti pada media standar (media LB). Pengujian dilakukan dengan menyebarkan 100 mikroliter kultur *R. solanacearum* pada OD<sub>600</sub> 0.3 pada media Nutrient Agar secara merata dan meletakkan kertas saring steril berdiameter 0.5 cm yang ditetesi dengan kultur *P. fluorescens*. Aktivitas antibiosis ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas saring

Pengamatan pada media biakan cair menunjukkan bahwa media yang memiliki pola pertumbuhan yang menyerupai pada media LB memiliki warna media kuning kehijauan, mengindikasikan adanya produksi senyawa metabolit sekunder. Sebaliknya media yang memiliki pola pertumbuhan bakteri jauh dibawah pola pertumbuhan bakteri pada media LB menunjukkan media yang keruh serta gelap (Gambar 4). Sementara itu modifikasi dengan penambahan ekstrak hewani dan gula pasir pada beberapa tingkat konsentrasi justru tidak mendukung pertumbuhan *P. fluorescens* serta warna media yang dihasilkan tidak menunjukkan adanya warna kuning kehijauan seperti pada media air kelapa dengan pola pertumbuhan menyerupai media LB

Fenomena serupa terjadi pada media limbah cair peternakan. Modifikasi limbah cair peternakan mampu memperbaiki pola pertumbuhan bakteri mendekati pola pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* pada media LB. Perbaikan pola pertumbuhan bakteri

juga diikuti oleh pendaran warna kuning kehijauan dari media yang telah dimodifikasi tersebut seperti terlihat pada Gambar 5D dimana limbah cair LCT3 mampu mendukung pertumbuhan *P. fluorescens* secara baik

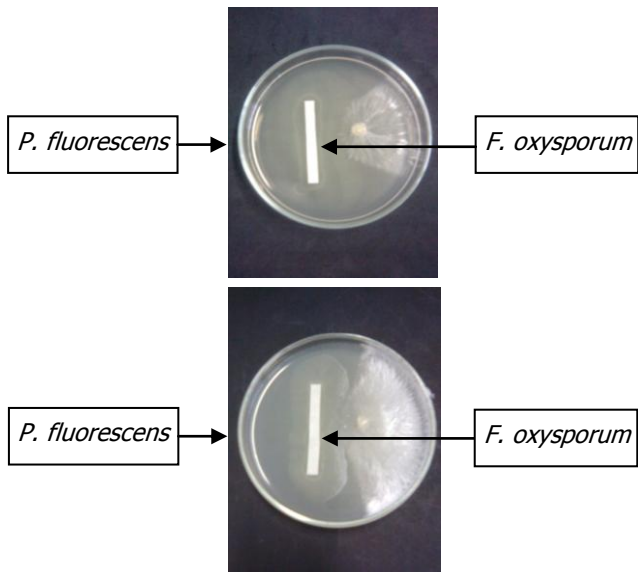


Gambar 5. Warna media pertumbuhan *Pseudomonas flourescens* pada air kelapa dan modifikasinya. A: air kelapa; B: air kelapa dengan penambahan 10% ekstrak jeroan dan 0% gula pasir; C: air kelapa dengan penambahan 10% ekstrak jeroan dan 1.25% gula pasir; D: air kelapa dengan penambahan 10% ekstrak jeroan dan 2.5% gula pasir. pH pada semua media disesuaikan menjadi pH 7.

Duffy dan Defago (1998) menyatakan tingkat produksi pigmen biru kehijauan atau hijau kekuningan berkorelasi positif dengan produksi senyawa siderofor dan antibiotika. Jenis-jenis antibiotika yang diproduksi oleh *Pseudomonas flourescens* antara lain *pyoluteorin* (PLT), *phenazine-1-carboxylase* (PCA) dan *2,4-diacetylphloroglucinol* (PHL). Menurut Hamdan *et al.*, (1991) antibiotika PCA menjadi faktor utama dalam menekan kejadian penyakit pada tanaman.

Hasil penelitian juga menunjukkan *P. fluorescens* yang dibiakkan pada limbah organik cair mampu menekan perkembangan cendawan *F. oxysporum*. Potensi tersebut ditunjukkan oleh adanya penghambatan pertumbuhan miselium cendawan yang berhadapan langsung dengan posisi agens hayati seperti terlihat pada Gambar 6. Secara umum

kecenderungan yang sama terjadi seperti pada penghambatan pertumbuhan *R. solanacearum* dimana modifikasi media limbah organik cair dengan penampakan hasil berwarna hijau kekuningan setelah diinokulasi bakteri *P. fluorescens* memberikan penekanan pertumbuhan *F. oxysporum*.

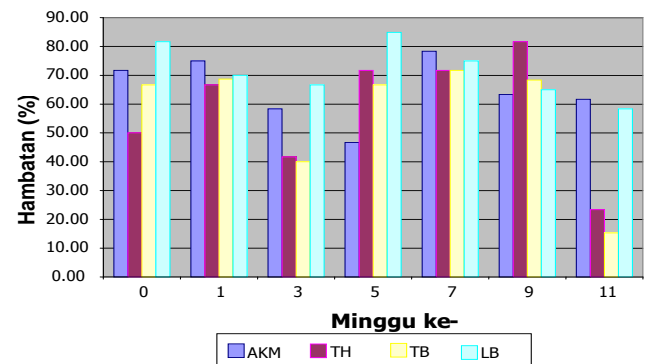


Gambar 6. Reaksi antagonisme *Pseudomonas fluorescens* terhadap *Fusarium oxysporum* pada media PDA. Efek antagonisme *P. fluorescens* ditandai dengan terhambatnya pertumbuhan miselium cendawan pada sisi yang berhadapan dengan bakteri antagonis.

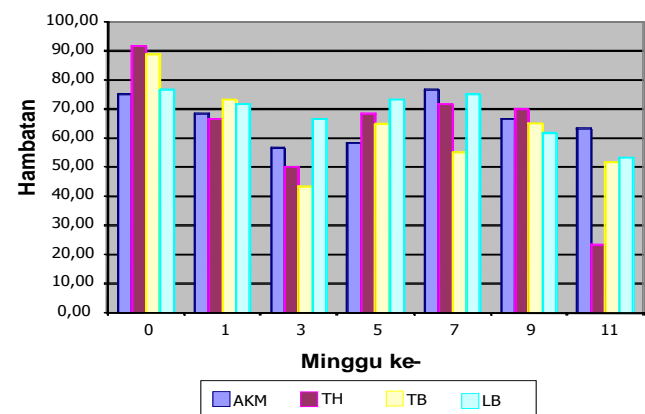
**Uji Efektivitas Antagonistik dan Daya Tahan *Pseudomonas fluorescens* pada Media Pertumbuhan Limbah Organik Cair**

Secara umum rata-rata persentase hambatan maksimum *P. fluorescens* terhadap *F. oxysporum* yang dibiakkan pada media LB pada penyimpanan minggu ke-0 hingga 11 tetap paling tinggi, hal yang sama ditunjukkan oleh efektifitas bakteri yang dibiakkan pada air kelapa baik pada penyimpanan suhu dingin maupun penyimpanan pada suhu ruang (Gambar 7 dan 8). Kemampuan *Pseudomonas fluorescens* menekan perkembangan berbagai macam patogen bisa dipahami karena bakteri ini mensintesis berbagai senyawa antibiotik seperti *phenazine carboxylic acid* (PCA), *pyrrolnitrin*, *oomycin A*, *2,4-diacetylphloroglucinol* (PhI), dan *pyoluteorin* (Plt) (Schnider *et al.*, 1995). Dilaporkan pula pada strain strain tertentu mampu memproduksi *hydrogen*

*cyanide* (HCN), *phospholipase C*, dan *exoprotease* (Heeb *et al.*, 2002).



Gambar 7. Rata-rata persentase hambatan maksimum *P. fluorescens* terhadap *F.oxysporum* pada media limbah organik cair pada beberapa minggu penyimpanan suhu ruang (AKM: air kelapa modifikasi; TH: limbah tahu; TB: tetes tebu dan LB: luria broth)

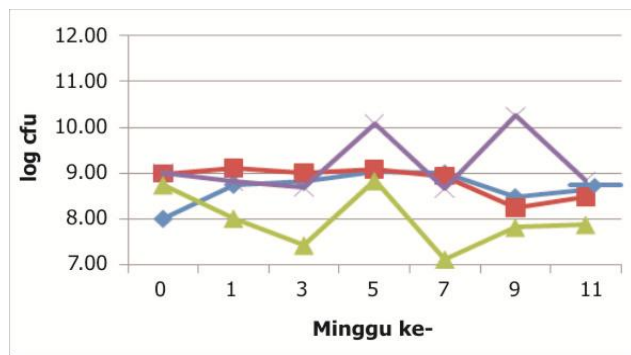


Gambar 8. Rata-rata persentase hambatan maksimum *P. fluorescens* terhadap *F.oxysporum* pada media limbah organik cair pada beberapa minggu penyimpanan suhu dingin (4°C) (AKM: air kelapa modifikasi; TH: limbah tahu; TB: tetes tebu dan LB: luria broth)

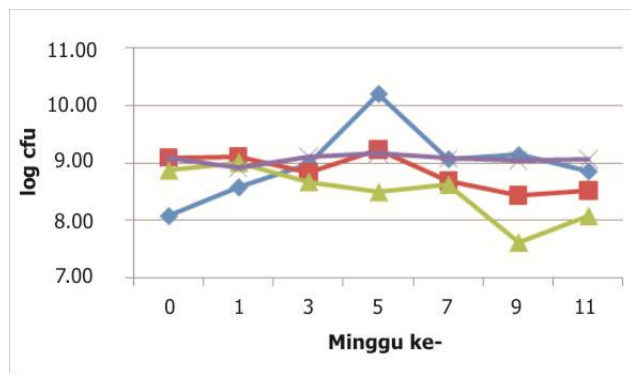
Aktivitas antagonistik tersebut berbanding lurus dengan tingkat populasi *P. fluorescens* selama penyimpanan baik pada suhu ruang maupun suhu dingin. Populasi *P. fluorescens* pada tiga bulan penyimpanan tidak mengalami penurunan yang sangat drastis, atau dengan kata lain bakteri agens hayati tersebut mampu bertahan hingga 11 minggu setelah dibiakkan pada limbah cair organi baik pada suhu ruang maupun pada suhu dingin (4°C)



(Gambar 9 dan 10). Hal ini memberikan keuntungan tersendiri dimana formulasi bakteri ini pada limbah organik cair dapat dilakukan untuk jangka waktu yang cukup lama. Dinamika populasi yang tinggi justru ada pada media standar laboratorium (media LB). Data dinamika populasi *P. fluorescens* yang dibiakkan pada berbagai media limbah cair serta dilakukan penyimpanan pada suhu ruang dan suhu dingin menunjukkan fluktuasi populasi yang rendah. Namun demikian secara umum penyimpanan pada suhu dingin memberikan stabilitas populasi yang lebih baik dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu ruang.



Gambar 9. Kepadatan populasi *P. fluorescens* yang dibiakkan pada berbagai limbah organik cair pada beberapa minggu penyimpanan suhu ruang (AKM: air kelapa modifikasi; TH: limbah tahu; TB: tetes tebu dan LB: luria broth)



Gambar 10. Kepadatan populasi *P. fluorescens* yang dibiakkan pada berbagai limbah organik cair pada beberapa minggu penyimpanan suhu dingin (4°C) (AKM: air kelapa modifikasi; TH: limbah tahu; TB: tetes tebu dan LB: luria broth)

### Uji Potensi Bio-pestisida *Pseudomonas fluorescens* Terhadap Penyakit Layu Bakteri pada Tomat dan Layu *Fusarium* pada Tanaman Semangka

Data kualitatif dari hasil pengamatan visual menunjukkan bahwa tanaman semangka yang diberi perlakuan agens hayati yang dibiakkan pada media LB (luria broth) dapat bertahan lebih baik dibandingkan dengan kontrol dari serangan patogen *Sclerotium rolfsii* serta memberikan efek pemicu pertumbuhan tanaman yang ditunjukkan dari vigoritas tanaman yang lebih baik dibandingkan kontrol. Namun demikian perlakuan agens hayati yang dibiakkan pada limbah air kelapa dan limbah tahu belum mampu menekan serangan *S. rolfsii*, tetapi mampu memberikan efek pertumbuhan tanaman yang lebih baik.



Gambar 11. Formulasi *Pseudomonas fluorescens* yang dibiakkan pada air kelapa dan limbah tahu dengan usulan nama produk BeMORE (*Beneficial Microorganism*) hasil Program Penelitian Insentif Riset Dasar tahun anggaran 2007-2008.

Hasil penelitian berupa produk formulasi bio-pestisida dan bio stimulator sedang diuji lebih lanjut keefektifannya pada beberapa jenis tanaman inang bekerjasama dengan peneliti lain. Penelitian pendahuluan menunjukkan aplikasi formulasi mampu meningkatkan produksi padi. Produk tersebut diberi nama BeMOR(e) (*Beneficial Microorganism*) dengan formulasi yang terus akan dikembangkan lebih lanjut baik dari kandungan bahan pembawa maupun jenis mikroba untuk kemudian bisa diproduksi secara

masal dan dikomersialkan seperti terlihat pada Gambar 11.

## KESIMPULAN

Limbah organik cair dengan atau tanpa penambahan nitrogen atau karbon pada konsentrasi tertentu dapat dijadikan media alternatif untuk pembiakan masal *P. fluorescens*. Air kelapa sangat baik digunakan untuk pertumbuhan *P. fluorescens* dengan cara memodifikasi pH hingga mencapai pH 7. Limbah cair peternakan dengan modifikasi penambahan 10% ekstrak jeroan ayam (ekstrak hewani) dapat mendukung pertumbuhan *P. fluorescens* lebih baik dibandingkan pertumbuhan bakteri pada media tanpa penambahan komponen apapun. Sementara itu limbah cair proses pembuatan tahu dan limbah sampah cair dapat memberikan pertumbuhan bakteri yang baik dengan penambahan 10% ekstrak jeroan ayam dan 1.25% gula pasir. Penggunaan tetes tebu 5% dengan penambahan 10% ekstrak jeroan ayam dan 2.5% gula pasir juga sangat baik bagi pertumbuhan *P. fluorescens*. Uji potensi antagonisme antara *P. fluorescens* dengan bakteri patogen *Ralstonia solanacearum* dan *F. oxysporum* yang ditumbuhkan pada media limbah cair organik termodifikasi secara umum menunjukkan potensi yang baik bagi penekanan patogen. Deteksi ekspresi senyawa antimikroba *phenazine* dan *pyoluteorin* dengan teknik hibridisasi *northern* menunjukkan ekspresi senyawa tersebut pada setiap fase pertumbuhan. Efektifitas dan daya tahan populasi *P. fluorescens* mampu bertahan hingga pada 11 minggu penyimpanan pada suhu ruang maupun suhu dingin (4°C).

Uji *in vivo* pada tanaman semangka menunjukkan bahwa perlakuan agen hayati *P. fluorescens* yang dibiakkan pada media Luria broth mampu menekan tingkat serangan penyakit layu fusarium serta meningkatkan vigor tanaman. Pada perlakuan lain menunjukkan bahwa aplikasi *P. fluorescens* yang dibiakkan pada media limbah organik air kelapa dan limbah kurang efektif menekan penyakit busuk pangkal batang, namun dapat memicu pertumbuhan tanaman.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Negara Riset dan Teknologi (KNRT) Republik Indonesia melalui program Penelitian Insentif Riset Dasar tahun anggaran 2007-2008. Ucapan terimakasih

penulis sampaikan kepada KNRT atas kepercayaan dan pendanaan yang telah diberikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Duffy BK, Defago G. 1999. Environmental factor modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2429-2438.
- Giyanto, A. A. Nawangsih dan K. H. Mutaqin. 1999. Analisis keragaman molekuler *Pseudomonas* kelompok *fluorescens* dengan teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dan studi potensi antagonistic terhadap *Ralstonia solanacearum* pada tomat. Laporan Penelitian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar. Dirjen Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional.
- Hamdan H, Weller DM, Thomashow LS. 1991. Relative importance of *fluorescens* siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-27 and M4-80R. *Applied Environmental Microbiology* 57(11):3270-3277.
- Heeb, S., C Blumer, and D. Haas. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J. Bacteriol.* 184:1046-1056.
- Howell, C. R. and R. D. Stipanovic. 1980. Suppression *Phytophthora ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology* 70:712-715.
- Igo, M. and Losick, R. 1986. Regulation of promoter that is utilized by minor forms of RNA polymerase holoenzyme in *Bacillus subtilis*. *J Mol. Biol.* 191:615-624.
- Loper, J. E. 1988. Role of *fluorescens* siderophore production in biological control of *Phytophthora ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78: 166-172.
- Paulsen Ian T., Caroline M Press, Jacques Ravel, Donald Y Kobayashi, Garry S A Myers, Dmitri V Mavrodi, Robert T DeBoy, Rekha Seshadri, Qinghu Ren, Ramana Madupu, Robert J Dodson, A Scott Durkin, Lauren M Brinkac, Sean C Daugherty, Stephen A Sullivan, Mary J

- Rosovitz, Michelle L Gwinn, Liwei Zhou, David J Schneider, Samuel W Cartinhour, William C Nelson, Janice Weidman, Kisha Watkins, Kevin Tran, Hoda Khouri, Elizabeth A Pierson, Leland S Pierson III, Linda S Thomashow & Joyce E Loper. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*. 5:873-878.
- Rodriguez, F. and W. F. Pfender. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology* 87:614-621.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Press. New York.
- Schnider, U., C. Keel, C. Blumer, J. Troxler, G. Defago, and D. Haas. 1995. Amplification of housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHAO enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* 177:5387-5392.
- Sharifi-Tehrani, A., M. Zala, A. Natsch, Y. Moenne Looco, and G. Defago. 1998. Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *fluorescens* pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rRNA. *Er. J. Plant. Pathol.* 104:631-643.
- Vigliar R, Sdepanian VL, Neto UF. 2006. Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in an inland region. *Jornal de Pediatria* 82(4):308-312.
- Xu, G. W., and D. C. Gross. 1986. Selection of *fluorescens* pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive potato seed piece decay. *Phytopathology* 414-422.