

**Keefektifan Bakteri Endofit dan Fungi Mikoriza Arbuskula
dalam Menekan *Ralstonia solanacearum* pada
Tanaman *Eucalyptus pellita***

Effectiveness of Endophytic Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal
Fungi in Suppressing *Ralstonia solanacearum* in
Eucalyptus pellita Plants

Yuliana Susanti¹, Giyanto^{1*}, Meity Suradji Sinaga¹,
Kikin Hamzah Mutaqin¹, Budi Tjahjono²

¹Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia.

²PT. Arara Abadi Sinarmas Forestry, Riau 28772, Indonesia.

ABSTRAK

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman eukaliptus (*Eucalyptus pellita*) di Indonesia. Salah satu pendekatan teknik pengendalian adalah melalui pemanfaatan bakteri endofit dan fungi mikoriza arbuskula (FMA). Penelitian ini ditujukan untuk mengevaluasi keefektifan bakteri endofit dan FMA dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri. Terdapat sepuluh kombinasi bakteri endofit dan FMA yang diujikan pada bibit eukaliptus berumur satu bulan. Inokulasi *R. solanacearum* secara buatan dilakukan tiga bulan setelah introduksi bakteri endofit dan FMA. Percobaan dilakukan di ruang *growth chamber*. Peubah pengamatan meliputi periode inkubasi, insidensi penyakit, laju penyakit, agresivitas kolonisasi bakteri dengan mengamati cairan bakteri (ooze) *R. solanacearum* pada bibit eukaliptus, pengukuran aktivitas *phenylalanine ammonia lyase* (PAL), dan total fenol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan B5F1 (*Paenibacillus polymyxa* dan *Glomus mosseae*) memiliki kemampuan penekanan tertinggi terhadap perkembangan penyakit layu bakteri pada bibit eukaliptus, yaitu sebesar 100%. Perlakuan B5F1 menunjukkan periode inkubasi *R. solanacearum* lebih lama, persentase insidensi penyakit paling rendah, laju infeksi penyakit rendah, dan penghambatan agresivitas kolonisasi *R. solanacearum* pada eukaliptus. Sementara perlakuan B4F1 (*Serratia marcescens* dan *G. mosseae*) mampu meningkatkan aktivitas PAL dan total fenol tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Berdasarkan hasil penelitian ini, perlakuan B5F1 dan B4F1 berpotensi mengendalikan penyakit layu bakteri pada tanaman eukaliptus.

Kata kunci: agresivitas, insidensi penyakit, laju infeksi, layu bakteri, periode inkubasi

ABSTRACT

Bacterial wilt disease (BWD) caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the important diseases of eucalyptus (*Eucalyptus pellita*) plants in Indonesia. One of the control technique approaches is the use of endophytic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). This study was aimed to evaluate the effectiveness of endophytic bacteria and AMF in suppressing the development of bacterial wilt disease. There were ten combinations of endophytic bacteria and AMF that were tested on one month

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: giyanto@apps.ipb.ac.id

old eucalyptus seeds. Artificial inoculation of *R. solanacearum* was carried out three months after introduction of endophytic bacteria and AMF. Experiments were carried out in the growth chamber. The observation variables included incubation period, disease incidence, disease rate, aggressiveness of bacterial colonization by *R. solanacearum*, measurement of phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity, and total phenol. The results showed that the combination of B5F1 (*Paenibacillus polymyxa* and *Glomus mosseae*) showed the highest suppression ability of the development of bacterial wilt disease in eucalyptus seedlings up to 100%. B5F1 treatment showed a longer incubation period of *R. solanacearum*, the lowest incidence of disease, low infection rates, and inhibited the aggressiveness of *R. solanacearum*. Meanwhile B4F1 (*Serratia marcescens* and *G. mosseae*) was able to increase PAL activity and the highest total phenol compared to other treatments. Based on the results of this study, the treatment of B5F1 and B4F1 has the potential to control bacterial wilt disease in eucalyptus plants.

Keywords: aggressiveness, bacterial wilt, disease incidence, incubation period, infection rate

PENDAHULUAN

Penyakit layu bakteri merupakan salah satu penyakit penting pada pertanaman hutan tanaman industri (HTI) di Indonesia dan di negara-negara penghasil utama tanaman eukaliptus (Ran *et al.* 2005). Penyakit layu bakteri pada tanaman eukaliptus disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*. Penyakit layu bakteri dilaporkan sebagai pembatas dalam produktivitas eukaliptus pada HTI dan menyebabkan kerugian yang sangat besar. Di Riau pada tahun 2010–2011 penyakit layu bakteri menyebabkan kerusakan di pembibitan dan di lapangan dengan kerugian ditaksir mencapai 16 milyar rupiah (Siregar *et al.* 2012). Gejala yang ditimbulkan ialah layu, daun menguning, dan terdapatnya ooze bakteri pada bagian batang tanaman yang terinfeksi (Coutinho dan Wingfield 2017).

Beberapa metode pengendalian penyakit layu bakteri telah dilakukan di antaranya adalah eradikasi, penggunaan bahan kimia sintetik, seleksi tanaman eukaliptus yang resisten, penanaman eukaliptus secara multiklon, dan deteksi penyakit layu bakteri secara molekuler pada bibit eukaliptus untuk memastikan bibit yang akan ditanam bebas bakteri patogen. Namun demikian upaya tersebut masih belum mendapatkan pengendalian yang efektif. Pengembangan pengendalian terhadap penyakit layu bakteri terus berlanjut hingga sekarang, salah satunya adalah teknik pengendalian hayati dengan penggunaan bakteri endofit dan FMA (fungi mikoriza arbuskula). Kombinasi bakteri endofit dan FMA dilaporkan memiliki

potensi untuk digunakan sebagai agens hayati pada beberapa kasus penyakit tanaman (Bagy *et al.* 2019; Rashad *et al.* 2020). Pengendalian penyakit layu bakteri pada eukaliptus dengan menggabungkan bakteri endofit dan FMA belum pernah dilakukan sebelumnya. Sampai saat ini pengendalian penyakit dilakukan dengan mengaplikasikan bakteri endofit dan FMA secara tunggal dalam pengendalian penyakit tanaman eukaliptus (Mafia *et al.* 2009; Santiago *et al.* 2015; Hashem *et al.* 2016; Agustini *et al.* 2020).

Bakteri endofit dapat mengolonisasi bagian internal jaringan tanaman tanpa efek yang merugikan pada tanaman inangnya (Upreti dan Thomas 2015). Bakteri endofit dapat mengurangi dan mencegah efek negatif dari patogen tertentu melalui berbagai mekanisme seperti antibiosis, pemacu pertumbuhan tanaman, *induced systemic resistance* (ISR), parasitisme, kompetisi, dan gangguan sinyal *quorum sensing* (QS) patogen (Amer dan Utkhede 2000; Collins dan Jacobsen 2003; Jataraf *et al.* 2005; Jorjani *et al.* 2012; Mansoori *et al.* 2013). Bakteri endofit sebagai agens biokontrol sering menunjukkan kombinasi beberapa mekanisme dalam menekan penyakit (Ongena *et al.* 2007).

FMA dapat berperan dalam pengendalian penyakit tanaman. Mekanisme yang terlibat dapat terjadi melalui peningkatan unsur hara tanaman, kompetisi untuk nutrisi, perubahan morfologi dan jaringan akar, perubahan komponen kimia jaringan tanaman, pengurangan tekanan abiotik, dan perubahan komposisi kelompok mikroba pada mikoriza (Linderman 2000). Selain itu FMA dapat menginduksi

ketahanan tanaman. FMA mengaktifkan enzim pertahanan seperti fitoaleksin, fenilpropanoid, kitinase, β -1,3-glukanase, peroksidase, protein yang terkait dengan patogenesis (PR), callose, dan fenolik. Enzim-enzim ini meningkat jumlah dan aktivitasnya selama kolonisasi awal akar tanaman oleh FMA (Siddiqui *et al.* 2008). Berdasarkan permasalahan yang terjadi pada HTI eukaliptus, maka penelitian ini ditujukan untuk mengevaluasi keefektifan bakteri endofit dan FMA dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri pada tanaman eukaliptus.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Isolat Patogen, Agens Hayati dan Bibit Eukaliptus

Isolat Patogen. Isolat *R. solanacearum* diperoleh dari isolasi sampel tanaman eukaliptus yang terinfeksi penyakit layu bakteri. Pengambilan sampel dilakukan di area penanaman eukaliptus PT. Arara Abadi pada lima klon eukaliptus. Selanjutnya sampel tanaman dibawa ke laboratorium sebagai bahan untuk isolasi bakteri patogen. Isolat *R. solanacearum* yang berhasil diisolasi dimurnikan pada medium NAPSA (3 g *beef extract*, 2.5 g glukosa, 5 g pepton, 20 g sukrosa, 100 g ekstrak kentang, dan 20 g agar dalam 1000 mL akuades, serta 4 mL TZC diberikan setelah medium steril) yang merupakan kombinasi dari medium *nutrient agar* (NA) dengan *potato sucrose agar* (PSA) hasil modifikasi R&D PT. Arara Abadi. Isolat *R. solanacearum* dimurnikan dengan menggores koloni tunggal pada medium NAPSA. Isolat *R. solanacearum* dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologi meliputi morfologi koloni, uji Gram, uji oksidasi dan fermentasi, levan, *potato soft rot*, dan *hypersensitive response* (HR). Isolat *R. solanacearum* setelah dikarakterisasi selanjutnya diidentifikasi secara molekuler menggunakan primer spesifik Oli-1/Y2 dan primer universal 16S rRNA. Selanjutnya kelima isolat *R. solanacearum* dilakukan uji virulensi untuk mengetahui kemampuan infeksi dari masing-masing isolat. Hasil pengujian virulensi *R. solanacearum*

pada bibit eukaliptus menunjukkan bahwa galur kode Rs 18 memiliki virulensi tertinggi. Berdasarkan uji virulensi galur Rs 18 terpilih sebagai patogen uji dalam penelitian ini. Penyiapan galur Rs 18 dilakukan dengan menggoreskan koloni bakteri pada medium NAPSA dan diinkubasi selama 48 jam. Selanjutnya bakteri disuspensikan pada akuades steril dengan kepadatan populasi mencapai 10^8 cfu mL⁻¹.

Bakteri Endofit. Bakteri endofit diperoleh dari isolasi sampel akar sehat eukaliptus yang terdiri dari 6 klon tanaman (5 klon rentan dan 1 klon komersial perusahaan). Bakteri endofit yang berhasil diisolasi dimurnikan pada medium NA. Bakteri endofit dilakukan penapisan yang meliputi uji HR, hemolisis, patogenesitas, dan pertumbuhan pada bibit eukaliptus. Bakteri endofit hasil penapisan terpilih selanjutnya dikarakterisasi meliputi kemampuan antibiosis, produksi enzim protease dan AHL laktonase, hormon *indole acetic acid* (IAA), penambat nitrogen, dan pelarut fosfat. Setelah bakteri endofit dikarakterisasi dilakukan pemilihan bakteri endofit potensial dengan menggunakan metode *analytical hierarchy process* (AHP). Berdasarkan perhitungan metode AHP dipilih sepuluh bakteri endofit yang memiliki hasil nilai tertinggi. Sepuluh bakteri endofit tersebut diidentifikasi secara molekuler menggunakan primer universal 16S rRNA. Hasil identifikasi bakteri endofit berdasarkan sekuens gen 16S rRNA menunjukkan spesies bakteri endofit potensial sebagai agens biokontrol adalah *Bacillus cereus* (B1), *Stenotrophomonas maltophilia* (B2), *Serratia marcescens* (B4), *Paenibacillus polymyxa* (B5), *Brevundimonas olei* (B6), *B. megaterium* (B7), *S. marcescens* (B8), *P. polymyxa* (B9) dan *B. velezensis* (B10). Sepuluh bakteri endofit terpilih digunakan dalam penelitian ini. Penyiapan bakteri endofit dilakukan dengan meremajakan isolat bakteri endofit pada medium NA dan inkubasi selama 48 jam. Selanjutnya bakteri endofit dikulturkan pada medium *nutrient broth* (NB) dengan kepadatan populasi mencapai 10^8 cfu mL⁻¹.

Fungi Mikoriza Arbuskula (FMA). FMA yang digunakan dalam penelitian merupakan

koleksi R&D PT. Arara Abadi, yaitu *Glomus mosseae* (F1), *G. clarum* (F2), dan *G. intraradices* (F3). Ketiga jenis isolat FMA sebelumnya telah diperbanyak pada tanaman sorgum menggunakan medium tumbuh zeolit selama 3 bulan di *screen house*. Sebelum digunakan sebagai inokulan, dilakukan penghitungan spora. Pemanenan sorgum dilakukan dengan mengambil potongan akar sorgum dan zeolit, dimasukkan ke wadah plastik dan diberi label. Kepadatan spora dihitung dengan teknik penyaringan basah berdasarkan metode Brundrett *et al.* (1996). Sampel zeolit yang telah dihitung jumlah sporanya disimpan di dalam lemari pendingin dan siap digunakan sebagai inokulan FMA.

Bibit Tanaman Eukaliptus. Stek pucuk dari pohon induk eukaliptus disterilisasi permukaan dengan dicelupkan pada kloroks 0.5%, dibilas dengan akuades steril. Stek pucuk ditanam pada medium kokopit steril, dipelihara di rumah kaca. Bibit berumur 1 bulan sebagai fase awal perakaran tanaman muncul digunakan sebagai tanaman uji.

Uji Keefektifan Bakteri Endofit dan FMA

Pengujian menggunakan 10 kombinasi bakteri endofit dan FMA (berdasarkan nilai tertinggi pada olah data statistik dari peubah pengamatan kolonisasi akar, jumlah spora, tinggi tanaman, dan diameter batang eukaliptus), kontrol positif/KP (inokulasi *R. solanacearum*), dan kontrol negatif/KN (tanpa inokulasi *R. solanacearum*, bakteri endofit, dan FMA). Kombinasi bakteri endofit dan FMA yang terpilih adalah B5F1, B7F1, B2F3, B6F3,

B1F1, B4F1, B8F1, B8F2, B10F1, dan B10F2 (Tabel 1). Setiap perlakuan yang diuji dilakukan pengulangan sebanyak 10 tanaman.

Aplikasi Bakteri Endofit dan FMA.

Aplikasi bakteri endofit dilakukan dengan cara: seluruh bagian pangkal batang bibit eukaliptus direndam selama 1 jam dalam suspensi bakteri endofit dengan kepadatan populasi 10^8 cfu mL⁻¹. Aplikasi FMA sebanyak 2 g zeolit (± 200 spora) per tanaman dilakukan satu bulan setelah aplikasi bakteri endofit, dengan cara memberikan inokulum FMA ke dalam medium tanam yang bersentuhan dengan akar bibit eukaliptus.

Aklimatisasi Bibit Eukaliptus di Ruang Growth Chamber. Bibit eukaliptus yang telah diaplikasikan dengan bakteri endofit dan FMA dipelihara di *screen house* selama 3 bulan. Selanjutnya, bibit eukaliptus dipindahkan ke dalam ruangan *growth chamber* dengan suhu ± 28 °C, kelembapan udara > 80%, fotoperiode 12 jam dan intensitas cahaya 40 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, dan diaklimatisasi selama 2 minggu (Fonseca *et al.* 2015). Bibit eukaliptus yang telah diaklimatisasi, diinokulasi dengan bakteri *R. solanacearum*.

Inokulasi *Ralstonia solanacearum*.

Inokulasi *R. solanacearum* dilakukan secara buatan, mengacu pada metode Fonseca *et al.* (2015), yaitu bibit eukaliptus dikeluarkan dari tabung, kemudian akar dilukai menggunakan gunting steril dan dicelupkan ke dalam suspensi *R. solanacearum* (10^8 cfu mL⁻¹) selama 5 menit per tanaman. Bibit eukaliptus dimasukkan kembali ke dalam tabung yang berisi medium tanam.

Tabel 1 Kombinasi perlakuan bakteri endofit dan FMA

No	Kode Perlakuan	Spesies bakteri endofit dan FMA
1	B1F1	<i>Bacillus cereus</i> dan <i>Glomus mosseae</i>
2	B4F1	<i>Serratia marcescens</i> dan <i>Glomus mosseae</i>
3	B8F1	<i>Serratia marcescens</i> dan <i>Glomus mosseae</i>
4	B8F2	<i>Serratia marcescens</i> dan <i>Glomus clarum</i>
5	B10F1	<i>Bacillus velezensis</i> dan <i>Glomus mosseae</i>
6	B10F2	<i>Bacillus velezensis</i> dan <i>Glomus clarum</i>
7	B5F1	<i>Paenibacillus polymyxa</i> dan <i>Glomus mosseae</i>
8	B7F1	<i>Bacillus megaterium</i> dan <i>Glomus mosseae</i>
9	B2F3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> dan <i>Glomus intraradices</i>
10	B6F3	<i>Brevundimonas olei</i> dan <i>Glomus intraradices</i>

Pengamatan

Perkembangan Gejala Penyakit, Periode Inkubasi, Insidensi dan Penekanan Penyakit pada Bibit Eukaliptus. Gejala penyakit dan periode inkubasi diamati setiap hari setelah inokulasi sampai munculnya gejala awal layu bakteri. Insidensi penyakit dihitung menggunakan rumus:

$$IP = \frac{n}{N} \times 100\%, \text{ dengan}$$

n, jumlah tanaman yang menunjukkan gejala layu dan N, jumlah tanaman yang diamati.

Penyakit layu bakteri adalah penyakit dengan tipe monosiklik sehingga laju infeksi dihitung dengan rumus Van der Plank (1963):

$$r = \frac{e}{t} \times \left[\log \frac{1}{1 - X_t} - \log \frac{1}{1 - X_0} \right], \text{ dengan}$$

e, bilangan hasil konversi (2714); t, selang waktu pengamatan; X_t , insidensi penyakit pada waktu tertentu; dan X_0 , insidensi penyakit pada waktu sebelumnya.

Persentase penekanan penyakit dihitung dengan rumus Aliye *et al.* (2008):

$$PR = \frac{P_c - P_t}{P_c} \times 100\%, \text{ dengan}$$

P_c , insidensi penyakit pada kontrol positif; P_t , insidensi penyakit pada masing-masing perlakuan.

Tingkat Agresivitas Kolonisasi *Ralstonia solanacearum*. Bibit eukaliptus uji dievaluasi perkembangan gejala penyakit layu setiap hari dengan mengamati ooze bakteri *R. solanacearum* pada jaringan tanaman. Pengamatan dilakukan secara kualitatif dengan melihat ada atau tidak adanya ooze pada sayatan jaringan batang tanaman. Apabila jaringan tanaman terdapat ooze bakteri, maka hal tersebut menandakan terjadinya kolonisasi (positif) dan sebaliknya jaringan tanpa adanya ooze maka tidak terjadi kolonisasi (negatif). Tanaman yang layu langsung diamati dengan cara menyayat batang tanaman, yang terdiri atas tiga bagian sayatan, yaitu bawah (pangkal batang), tengah (3 cm dari bawah), atas (6 cm dari bawah) disayat menggunakan pisau bedah dan diletakkan di atas gelas objek yang diberi setetes air. Potongan sayatan batang diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40–100x.

Pengamatan seluruh peubah dilakukan selama dua minggu, dimulai sejak awal inokulasi *R. solanacearum*.

Analisis Metabolit Sekunder Penginduksi Ketahanan

Analisis metabolit sekunder sebagai penginduksi ketahanan tanaman terhadap *R. solanacearum* dengan mengukur aktivitas *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) dan total fenol pada tanaman uji. Data yang disajikan merupakan peningkatan persentase aktivitas PAL dan fenol, yaitu pengurangan aktivitas PAL dan senyawa fenol sebelum dan setelah inokulasi bakteri *R. solanacearum*. Sampel daun bibit eukaliptus dianalisis pada umur 12 minggu sebelum inokulasi dan umur 14 minggu setelah inokulasi *R. solanacearum*. Sampel dianalisis pada masing-masing perlakuan sebanyak 3 tanaman secara komposit.

Analisis Total Fenol. Analisis kuantitatif total fenol dilakukan menggunakan metode Konappa *et al.* (2016). Perubahan warna biru diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 725$ nm dengan katekol sebagai standar. Jumlah fenolat dinyatakan sebagai mikrogram katekol⁻¹ mg⁻¹ protein.

Aktivitas PAL. Aktivitas PAL ditentukan berdasarkan metode Chmielowska *et al.* (2008). Konsentrasi asam *trans-sinamat* diukur dengan spektrofotometri pada $\lambda = 290$ nm dan aktivitas enzim dinyatakan sebagai A_{290} mg *cinnamic acid* menit⁻¹ mg⁻¹ protein. Sampel daun bibit eukaliptus yang digunakan untuk analisis aktivitas PAL sama dengan sampel untuk analisis total fenol.

HASIL

Perkembangan Gejala Penyakit Layu Bakteri

Perkembangan gejala penyakit layu bakteri diawali dengan munculnya layu pada bagian pucuk daun dan cabang-cabang tanaman yang muda. Gejala berlanjut dengan mengeringnya daun bagian bawah hingga berlanjut ke daun bagian atas. Layu akan semakin parah dengan

bertambahnya hari sejak munculnya gejala. Perkembangan penyakit lebih lanjut menyebabkan tanaman layu keseluruhan dan terjadi perubahan warna kehitaman pada batang tanaman (Gambar 1). Tanaman kontrol positif menunjukkan gejala awal tiga hari setelah inokulasi *R. solanacearum* sedangkan pada perlakuan aplikasi bakteri endofit dan FMA gejala awal muncul lima hari setelah inokulasi *R. solanacearum*.

Periode dan Insidensi Penyakit Layu Bakteri

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa periode inkubasi penyakit pada tanaman uji dengan perlakuan B10F2, B5F1, B7F1, B2F3, dan B6F3 terlihat lebih lama (> 8 hari) dibandingkan dengan kontrol positif. Perlakuan B5F1 dan B6F3 menunjukkan periode inkubasi lebih lama dari kontrol dengan insidensi penyakit yang rendah. Aplikasi B5F1 merupakan perlakuan terbaik dalam menekan insidensi penyakit. Pada perlakuan kontrol negatif, seluruh tanaman uji tidak terdapat gejala (Tabel 2).

Laju Infeksi Penyakit Layu Bakteri

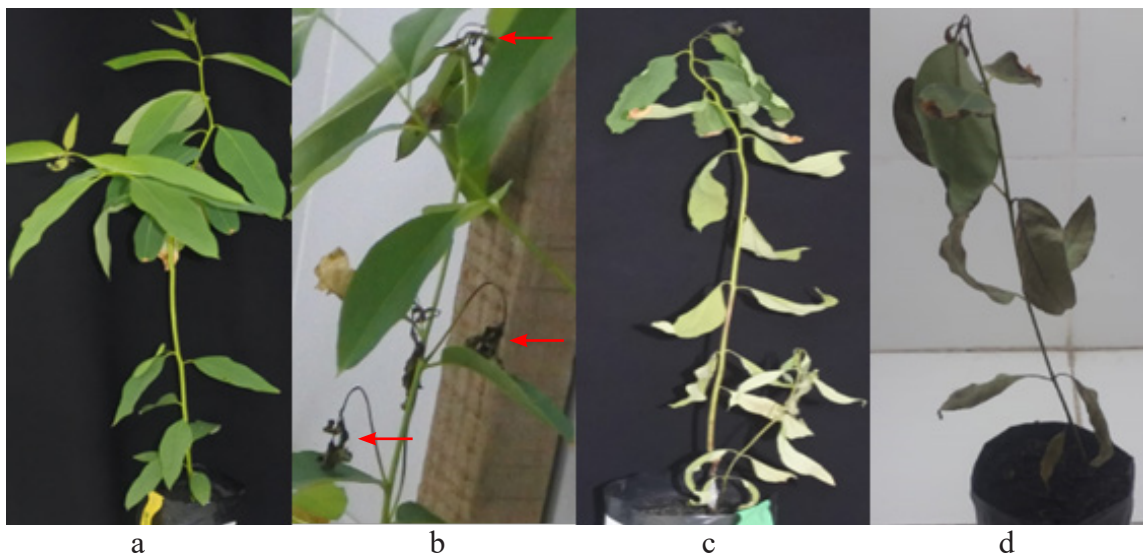
Hasil pengukuran laju infeksi setelah munculnya gejala awal menunjukkan bahwa perlakuan B7F1, B2F3, B6F3, B1F1, B4F1, B8F2, B10F1, B10F1, dan B5F1 memiliki laju infeksi lebih rendah dari kontrol positif.

Tanaman uji dengan perlakuan B5F1 menunjukkan laju infeksi paling rendah. Pada tanaman uji kontrol negatif, tidak terjadi perkembangan gejala layu (Gambar 2).

Tingkat Agresivitas Kolonisasi *Ralstonia solanacearum* pada Bagian Batang Bibit Eukaliptus

Jaringan tanaman uji yang diintroduksi dengan bakteri endofit dan FMA pada seluruh kombinasi perlakuan menunjukkan persentase ooze bakteri *R. solanacearum* lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif. Perlakuan B5F1 menjadi perlakuan terbaik karena tidak ditemukan ooze bakteri pada jaringan batang tanaman uji yang diamati (persentase 0). Tanaman kontrol negatif tidak ditemukan ooze (Gambar 3). Kolonisasi *R. solanacearum* pada bagian bawah sayatan batang (pangkal batang) mendominasi lokasi ooze terbanyak dari semua perlakuan, sedangkan bagian tengah sayatan batang (3 cm dari bawah pangkal batang) terdapat ooze bakteri lebih sedikit, demikian halnya dengan bagian atas sayatan batang (6 cm dari bawah pangkal batang).

Jaringan tanaman yang diamati menggunakan mikroskop cahaya menunjukkan setiap bagian sayatan ada terdapat ooze (positif) dan ada yang tidak terdapat ooze (negatif) (Gambar 4). Ooze bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman menandakan terjadinya kolonisasi

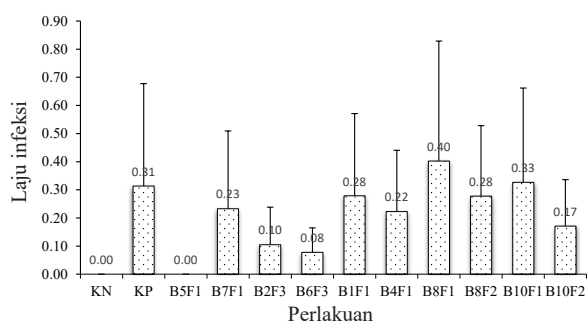


Gambar 1 Perkembangan gejala penyakit layu bakteri pada bibit tanaman eukaliptus: a, tanaman sehat sebagai kontrol negatif; b, gejala awal; c, gejala lanjut; dan d, tanaman mati.

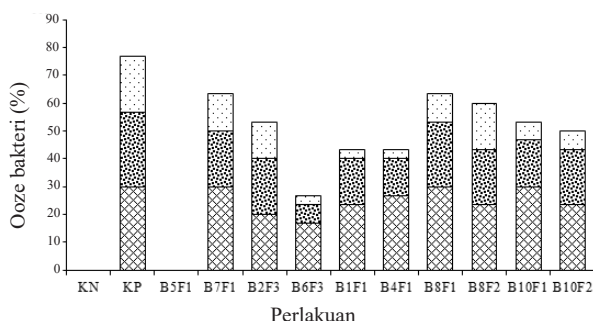
Tabel 2 Penekanan periode inkubasi dan insidensi penyakit layu bakteri pada perlakuan bakteri endofit dan FMA

Perlakuan	Periode inkubasi (hari)	Insidensi penyakit (%)	Penekanan penyakit (%)
KN	Tt	Tt	Tt
KP	7.89	90	0
B1F1	7.50	80	11
B4F1	7.25	80	11
B8F1	7.22	90	0
B8F2	7.00	70	22
B10F1	7.00	80	11
B10F2	8.14	70	22
B5F1	Tt	Tt	100
B7F1	8.25	80	11
B2F3	9.33	60	33
B6F3	9.40	50	44

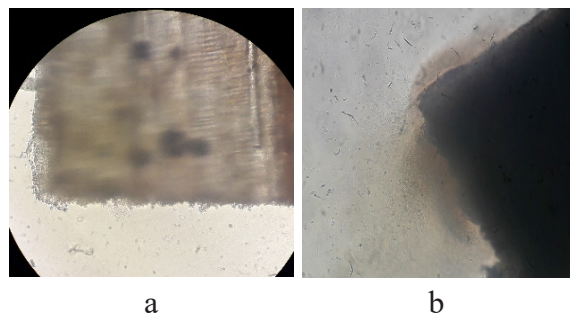
Tt = Tidak terdeteksi (tidak terdapat gejala)



Gambar 2 Rata-rata laju infeksi *R. solanacearum* pada bibit eukaliptus dengan berbagai macam perlakuan bakteri endofit dan FMA.



Gambar 3 Persentase kolonisasi bakteri *R. solanacearum* pada bibit eukaliptus dengan berbagai macam perlakuan bakteri endofit dan FMA. ▨, pangkal batang; ▩, batang bagian tengah; ▤, batang bagian atas.



Gambar 4 Jaringan batang tanaman eukaliptus: a, tanpa ooze bakteri *R. solanacearum*; dan b, ada ooze bakteri *R. solanacearum*.

bakteri *R. solanacearum*. Hampir keseluruhan bagian sayatan bawah batang ditemukan ooze bakteri. Hal ini diduga disebabkan teknik inokulasi yang digunakan adalah pelukaan akar tanaman.

Aktivitas PAL dan Total Fenol pada Bibit Eukaliptus yang diaplikasikan dengan Bakteri Endofit dan FMA

Perlakuan B1F1, B4F1, dan B10F1 menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas PAL yang tinggi dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif, sedangkan peningkatan total fenol lebih tinggi dari kontrol terdapat pada perlakuan B1F1, B4F1, B10F1, B5F1, B2F3, dan B6F3. Peningkatan aktivitas PAL dan total fenol tertinggi ditemukan pada tanaman uji dengan perlakuan B4F1 (Tabel 3). Tanaman pada perlakuan B8F1 dan B8F2 tidak dapat dianalisis karena tanaman telah mati setelah diinokulasi dengan *R. solanacearum*.

PEMBAHASAN

Penyakit layu bakteri merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman *E. pellita* yang disebabkan oleh *R. solanacearum*. Patogen ini menular melalui tanah dan infeksi ke tanaman umumnya terjadi melalui akar (Hayward 1991). Pengendalian penyakit layu bakteri sulit karena variabilitas patogen yang tinggi, pilihan pestisida kimia yang terbatas, tingkat kelangsungan hidup patogen yang tinggi di berbagai lingkungan dan kisaran inang yang luas.

Tabel 3 Peningkatan aktivitas PAL dan total fenol pada bibit eukaliptus terinfeksi *R. solanacearum*

Perlakuan	Peningkatan (%)	
	Aktivitas PAL	Total fenol
KN ^b	2.536	0.421
KP ^a	3.426	0.697
B1F1	13.085	199.552
B4F1	97.377	229.885
B8F1	Td	Td
B8F2	Td	Td
B10F1	-32.677	46.703
B10F2	167.422	-41.121
B5F1	-45.151	16.571
B7F1	-48.786	-10.744
B2F3	-27.635	64.1150
B6F3	-1.931	76.836

^aTanaman dengan inokulasi *R. solanacearum*

^bTanaman tanpa inokulasi *R. solanacearum*, bakteri endofit dan FMA

Td = Tidak dianalisis

Pengendalian penyakit layu bakteri telah dilakukan dengan berbagai upaya, namun belum mampu mengatasi perkembangan penyakit layu bakteri pada perkebunan eukaliptus. Untuk itu diperlukan teknik pengendalian yang ramah lingkungan, biaya rendah dan efisien dalam skala luas. Pendekatan yang dapat dilakukan adalah pengendalian hayati. Penggunaan agens biokontrol seperti bakteri endofit dan FMA dapat menekan atau menurunkan kepadatan populasi patogen tanaman (Afzal *et al.* 2019; Pozo *et al.* 2013). Keuntungan dari pengendalian hayati adalah dapat diterapkan pada target yang luas atau sempit tergantung pada organisme biokontrol, kurang spesifik dan kurang rentan terhadap akumulasi ketahanan, hemat biaya dan dapat diintegrasikan dengan strategi pengendalian lainnya (Whipps dan Lumsden 2001).

Tanaman yang terinfeksi menunjukkan gejala layu pada daun, umumnya dimulai bagian pucuk dan selanjutnya daun mengering. Infeksi lanjut akan menyebabkan keseluruhan bibit eukaliptus layu dan akhirnya mengalami kematian. Aplikasi B5F1, B7F1, B2F3, dan B6F3 pada bibit eukaliptus dapat memperpanjang periode inkubasi dan menurunkan insidensi penyakit. Hasil ini sesuai dengan

penelitian sebelumnya bahwa bakteri endofit yang diintroduksi pada tanaman cabai dapat memperpanjang masa inkubasi penyakit layu bakteri, menurunkan insidensi dan keparahan penyakit (Habazar *et al.* 2020) dan aplikasi *Paenibacillus polymyxa* dapat menekan perkembangan *R. solanacearum* sebesar 80% pada tanaman kentang (Soliman 2020). Demikian halnya dengan inokulasi FMA pada tomat dapat mencegah infeksi *R. solanacearum* (Tahat *et al.* 2012).

Seluruh kombinasi aplikasi bakteri endofit dan FMA pada bibit eukaliptus mampu menurunkan laju infeksi penyakit layu bakteri. Namun pada perlakuan B8F1 dan B10F1 laju infeksi lebih cepat dibandingkan dengan tanaman kontrol. Hal tersebut berarti bahwa perkembangan penyakit layu bakteri tidak mampu ditekan oleh bakteri endofit dan FMA yang diintroduksikan ke tanaman.

Tingkat kolonisasi *R. solanacearum* pada bibit eukaliptus memiliki persentase ooze lebih rendah dengan aplikasi perlakuan bakteri endofit dan FMA. Ooze bakteri *R. solanacearum* yang diinokulasikan pada bibit eukaliptus dengan teknik pelukaan akar lebih sedikit untuk berkembang sampai ke bagian atas batang tanaman, hal ini diduga karena adanya bakteri endofit dan FMA yang mengkolonisasi perakaran tanaman. Agens biokontrol dapat menghambat perkembangan penyakit dengan beberapa mekanisme. Bakteri endofit secara tidak langsung dapat menghambat perkembangan patogen melalui berbagai mekanisme seperti antibiotik, siderofor, enzim hidrolitik, dan senyawa volatil (Afzal *et al.* 2019). FMA telah terbukti bersaing secara langsung dengan patogen untuk mendapatkan ruang dan nutrisi, mengubah morfologi akar yang dapat mengubah dinamika infeksi patogen (Pozo *et al.* 2013).

Peningkatan aktivitas PAL dan total fenol pada beberapa perlakuan bakteri endofit dan FMA menunjukkan terjadinya induksi ketahanan tanaman. Perlakuan B4F1 merupakan kombinasi perlakuan yang menunjukkan induksi ketahanan tanaman terbaik dibandingkan dengan perlakuan lain. Kemampuan dari

jenis bakteri endofit dan FMA dapat melibatkan satu mekanisme atau lebih dalam pengendalian penyakit tanaman. Peningkatan aktivitas PAL dan fenol dikarenakan agens hayati menghasilkan elisitor yang dapat menginduksi respons pertahanan tanaman. Banyak elisitor yang dihasilkan oleh agens biokontrol dalam menginduksi ketahanan tanaman, seperti elisitor PeBA1 dari *B. amyloliquifaciens* dan *B. subtilis* BU412 dapat menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau dengan meningkatkan enzim-enzim pertahanan (Wang *et al.* 2016; Shen *et al.* 2019). FMA memiliki molekul permukaan seperti kitin dan glukukan, dan oligomernya yang dapat menginduksi respons pertahanan tanaman inang (Song *et al.* 2011). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *S. marcescens* dan *G. mosseae* mampu meningkatkan metabolit sekunder, yaitu PAL dan fenol pada tanaman *Camellia sinensis* dan beberapa tanaman obat (Chakraborty *et al.* 2010; Pedone-Bonfim *et al.* 2015). Produksi senyawa fenol dipicu sebagai respons terhadap berbagai rangsangan oleh ekspresi gen PAL dan aktivitas protein (Mandal *et al.* 2010).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aplikasi bakteri endofit dan FMA, yaitu kombinasi bakteri *P. polymyxa* dan fungi *G. mosseae* (B5F1), serta *S. marcescens* dan *G. mosseae* (B4F1) berpotensi menghambat perkembangan penyakit layu bakteri dan menginduksi ketahanan tanaman eukaliptus. Dalam aplikasi selanjutnya pada skala luas, masih diperlukan evaluasi frekuensi aplikasi bakteri endofit dan FMA, metode aplikasi di ruang *growth chamber*, dan kajian aplikasi bakteri endofit dan FMA secara tunggal sebagai pembandingan hasil perlakuan kombinasi aplikasi dari kedua agens hayati tersebut yang telah diperoleh dalam penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dirjen DIKTI yang membantu dana penelitian melalui Beasiswa BPPDN dan Hibah Penelitian Disertasi Doktor, dan Departemen Riset and Development PT. Arara Abadi Sinarmas Forestry, Perawang-Riau.

DAFTAR PUSTAKA

- Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol Res.* 221:36–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>.
- Agustini L, Irianto RSB, Indrayadi H, Tanna RD, Fahrizawati, Faulina SA, Hidayat A, Tjahjono B, Priatna D, Turjaman M. 2020. The effects of arbuscular mycorrhizal inoculation to growth and survivability of micropropagated *Eucalyptus pellita* and *Acacia crassicarpa* in nursery. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.* 533(1):1–11. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/533/1/012028>.
- Aliye N, Fininsa C, Hiskias Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biol Control.* 47(3):282–288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.09.003>.
- Amer GA, Utkhede RS. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can J Microbiol.* 46(9):809–816. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-46-9-809>.
- Bagy HMMK, Hassan EA, Nafady NA, Dawood MFA. 2019. Efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic strain *Epicoccum nigrum* ASU11 as biocontrol agents against blackleg disease of potato caused by bacterial strain *Pectobacterium carotovora* subsp. *atrosepticum* PHY7. *Biol Control.* 134:103–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.005>.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Examining mycorrhizal associations. Di dalam: Lynch P, editor. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture.* Canberra (AU): Australian Centre for International Agriculture Research.
- Chakraborty U, Chakraborty BN, Chakraborty AP. 2010. Influence of *Serratia marcescens*

- TRS-1 on growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* against *Fomes lamaoensis*. *J Plant Interact.* 5(4): 261–272. DOI: <https://doi.org/10.1080/17429140903551738>.
- Chmielowska J, Deckert J, Diaz J. 2008. Activity of peroxidases and phenylalanine ammonia-lyase in lupine and soybean seedlings treated with copper and an ethylene inhibitor. *Biol Lett.* 45:59–67.
- Collins DP, Jacobsen BJ. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biol Control.* 26(2):153–161. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00132-9](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00132-9).
- Coutinho TA, Wingfield MJ. 2017. *Ralstonia solanacearum* and *R. Pseudosolanacearum* on eucalyptus: Opportunists or primary pathogens? *Front Plant Sci.* 8(761):1–7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00761>.
- Fonseca NR, Oliveira LSS, Guimaraes LMS, Teixeira RU, Lopes CA, Alfenas AC. 2015. An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. *Trop Plant Pathol.* 41(1):42–47. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0056-2>.
- Habazar T, Yanti Y, Daulay NR. 2020. In planta screening of chili roots endophyte bacteria to control bacterial wilt disease. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.* 583:1–12. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/583/1/012021>.
- Hashem A, Abd-Allah EF, Alqarawi AA, Al-Huqail AA, Wirth S, Egamberdieva D. 2016. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of *Acacia gerrardii* under salt stress. *Front Microbiol.* 7:1–15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01089>.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol.* 29:65–87. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>.
- Jataraf J, Radhakrims NV, Hannk P, Sakoof R. 2005. Biocontrol of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Sci Technol.* 15:55–65. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150400015920>.
- Jorjani M, Heydari A, Zamanizadeh HR. 2012. Controlling Sugar Beet Mortality Disease. *J Plant Prot Res.* 52(3):303–307. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0049-9>.
- Konappa NM, Maria M, Uzma F, Krishnamurthy S, Nayaka SC, Niranjana SR, Chowdappa S. 2016. Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. *Sci Hortic.* 207:183–192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.029>.
- Linderman RG. 2000. Effects of Mycorrhizas on Plant Tolerance to Diseases. Di dalam: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Norwell (MA): Kluwer Academic Publisher. hlm 345–365. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-017-0776-3_15.
- Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Binoti DHB, Mafia GMV. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. *Trop Plant Pathol.* 34(1):10–17. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1982-5676200900100002>.
- Mandal SM, Chakraborty D, Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav.* 5(4):359–368. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>.
- Mansoori M, Heydari A, Hassanzadeh N, Rezaee S, Naraghi L. 2013. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* bacterial antagonists for biological control of cotton Verticillium wilt disease. *J Plant Prot Res.* 53(2):154–157. DOI: <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0023>.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.* 9(4):1084–1090. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.

- Pedone-Bonfim MVL, da Silva FSB, Maia LC. 2015. Production of secondary metabolites by mycorrhizal plants with medicinal or nutritional potential. *Acta Physiol Plant.* 37(27):1–12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1781-3>.
- Pozo MJ, Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Azcon-Aguilar C, Barea JM. 2013. Root Allies: Arbuscular Mycorrhizal Fungi Help Plants to Cope with Biotic Stresses. Di dalam: Aroca R, editor. *Soil Biology*. Heidelberg (DE): Springer. hlm. 289–306. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4>.
- Ran L, Liu C, Wu G, VanLoon L, Bakker P. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biol Control.* 32(1):111–120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.08.007>.
- Rashad YM, Abbas MA, Soliman HM, Abdel-Fattah GG, Abdel-Fattah GM. 2020. Synergy between endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* GGA and arbuscular mycorrhizal fungi induces plant defense responses against white rot of garlic and improves host plant growth. *Phytopathol Mediterr.* 59(1):169–186. DOI: <https://doi.org/10.36253/phyto-11019>.
- Santiago TR, Grabowski C, Rossato M, Romeiro RS, Mizubuti ESG. 2015. Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. *Biol Control.* 80:14–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.007>.
- Shen Y, Li J, Xiang J, Wang J, Yin K, Liu Q. 2019. Isolation and identification of a novel protein elicitor from a *Bacillus subtilis* strain BU412. *AMB Express.* 9(1):1–9 DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0822-5>.
- Siddiqui ZA, Pichtel J. 2008. Mycorrhizae: an overview. Di dalam: Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K, editor. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Dordrecht (DE): Springer. hlm. 1:1–35. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7>.
- Siregar BA, Indrayadi H, Mardai. 2012. Ancaman Penyakit layu bakteri terhadap produktivitas *Eucalyptus pellita* di dataran rendah tropis. Laporan Tahunan R&D. Perawang (ID): R&D PT. Arara Abadi. hlm. 1–15.
- Soliman MA. 2020. *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus aryabhatai* as Biocontrol Agents against *Ralstonia solanacearum* In Vitro and In Planta. *JPPP.* 11(3):197–203. DOI: <https://doi.org/10.21608/jppp.2020.87024>.
- Song F, Song G, Dong A, Kong X. 2011. Regulatory mechanisms of host plant defense responses to arbuscular mycorrhiza. *Acta Ecol Sin.* 31(6):322–327. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2011.09.001>.
- Tahat MM, Sijam K, Othman R. 2012. The potential of endomycorrhizal fungi in controlling tomato bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* under glasshouse condition. *Afr J Biotechnol.* 11(67):13085–13094. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajb11.3629>.
- Upreti R, Thomas P. 2015. Root-associated bacterial endophytes from *Ralstonia solanacearum* resistant and susceptible tomato cultivars and their pathogen antagonistic effects. *Front Microbiol.* 6(255):1–12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00255>.
- Van der Plank JE. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. New York (NY): Academic Press.
- Wang N, Liu M, Guo L, Yang X, Qiu D. 2016. A novel protein elicitor (PeBA1) from *Bacillus amyloliquefaciens* NC6 induces systemic resistance in Tobacco. *Int J Biol Sci.* 12(6):757–767. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.14333>.
- Whipps JM, Lumsden RD. 2001. Commercial use of fungi as plant diseases biological control agents: status and prospects. Di dalam: Butt, TM, Magan N, editor. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Wallingford (GB): CABI Publishing. hlm. 9-22.