

Identifikasi dan Kuantifikasi Metabolit Bakteri Pelarut Fosfat dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas *Rhizoctonia solani* pada Tanaman Kedelai

Tri Candra Setiawati¹ dan Paniman Asna Mihardja²

Makalah diterima 10 Maret 2008 / disetujui 7 Juli 2008

ABSTRACT

Identification and Quantification of Phosphate Solubilizing Bacteria Metabolites and their Effect to *Rhizoctonia solani* Activity in Soybean (T.C. Setiawati and P.A. Mihardja): Phosphate solubilizing bacteria (PSB) metabolites are organic acids, phosphomonoesterase enzyme (alkaline phosphatase) and antibiotic, which is able to dissolve insoluble phosphate. Phosphate solubilizing bacteria used in this study was expected to suppress *Rhizoctonia solani* attacks. This experiment was aimed at (1) identifying and quantifying PSB metabolites, and (2) examining their capability as biocontrol agent for *Rhizoctonia solani* *in vitro* and hydroponics soybean. This study was conducted in three stages. The first stage of this study was culturing two PSB isolates (*Pseudomonas putida* 27.4B and *Pseudomonas diminuta*) in the *Pikovskaya* medium to analyze their metabolites. The second and third stage of this study was testing the antagonist of two bacteria to suppress *R. solani* activity, which was conducted *in vitro*, and in hydroponics medium soybean as indicator plant. The results showed that *P. putida* 27.4B and *P. diminuta* produced organic acids i.e.: citrate, formic, succinic, acetic, propionate, butyrate, and oxalate. The totals of organic acids from each bacterium were 70,3 mg.kg⁻¹ and 61,9 mg.kg⁻¹. Production of alkaline phosphatase enzyme in *Pikovskaya* medium of *P. Putida* 27.4B was 11,71 µg pNP.mL⁻¹.h⁻¹ and *P. diminuta* was 24,04 µg pNP.mL⁻¹.h⁻¹. Concentration of this enzyme in soil medium was higher than that in *Pikovskaya* medium with 26,27 µg pNP.g⁻¹.h⁻¹ and 39,03 µg pNP.g⁻¹.h⁻¹ respectively. This study also showed that total concentration of antibiotics (tetracycline, oxitetracycline and penicillin) produced by the PSB, were 3,2 µg.mL⁻¹ (*P. putida* 27.4B) and 10,96 µg.mL⁻¹ (*P. diminuta*), respectively. The results from second stage of this study showed that by using *in vitro*, the reduced growth of *R. solani* was observed 58,35% with *P. putida* 27.4B and 41,96% with *P. diminuta*. In addition, inoculations of PSB in hydroponics medium reduced the fungal pathogenesis from 10,71% to 21,42% of pre and post emergence damping-off. Visually, the symptom of pathogen attack appeared within the period of 2 until 14 days after infection.

Keywords: Alkaline phosphatase enzyme, organic acids, *P. putida*, *P. diminuta*, *R. solani*

PENDAHULUAN

Mekanisme rhizobacteria yang bersifat antagonis terhadap patogen tanaman antara lain: produksi antibiotik, kompetisi dan sifat parasitik (Kloepper, 1993). Interaksi antara antagonis dengan patogen dikatakan bersifat antibiosis apabila antagonis dapat menghasilkan sejenis antibiotik yang mudah menguap dan menyebabkan lisis pada hifa patogen.

Bakteri gram negatif khususnya strain *Pseudomonas* telah banyak diteliti sebagai agen biokontrol karena kemampuannya memproduksi

metabolit antimikroba. Strain *Pseudomonas* sp. dapat menghasilkan tropolone yang bersifat bioaktif pada tanaman, jamur dan bakteri, selain itu *P. fluorescens* pada rhizosphere tanaman kapas sehat dapat memproduksi antibiotik pyrrolnitrat dan pyoluteoren (Kloepper, 1993). Trujillo *et al.* (2007) dalam penelitiannya mendeteksi produksi beberapa jenis antibiotik dengan spectrum luas dari bakteri pelarut fosfat (BPF) *P. fluorescens* PFBV1 yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri gram negatif (*Proteus vulgaris*), bakteri gram positif (*Bacillus subtilis*) dan yeasts (*Candida albicans*). Nematoda

¹Jurusan Tanah, ²Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Kampus Tegalboto 68121

¹Penulis korespondensi: Tri Candra Setiawati, email: candra_setiawati@yahoo.com

J. Tanah Trop., Vol. 13, No. 3, 2008: 233-240

ISSN 0852-257X

Meloidogyne incognita dihambat efek patogenitasnya oleh BPF *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *P. fluorescens* dan *P. stutzeri* (Khan *et al.*, 2007).

Setiawati (2002) telah menguji efektivitas beberapa BPF yaitu *P. putida* 27.4B, *P. diminuta*, *Bacillus* sp. dan *Chromobacterium violaceum* untuk bersinergis dan menguji sifat antagonis masing-masing BPF tersebut beserta kombinasinya terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* yang bersifat patogen terhadap tanaman tembakau. Secara *in vitro* BPF dapat menghambat pertumbuhan dan menurunkan tingkat serangan pada tanaman saat diuji di rumah kaca.

Asaka dan Shoda (1996) menggunakan BPF *Bacillus subtilis* RB14 sebagai biokontrol dari *R. solani* penyebab damping-off pada tanaman tomat karena kemampuannya memproduksi antibiotika iturin A dan surfactin. *P. aurefaciens* mampu menghambat pertumbuhan fungi patogen *Alphanomycetes euteiches* karena menghasilkan siderophores (Carruthers, Conner and Mahanty, 1994). Kehadiran siderophore akan mengkhelat Fe^{+3} sehingga fungi patogen tidak memperoleh Fe yang dibutuhkan, selain itu juga produksi antibiotika 2,4 diacetophloroglucinol oleh bakteri tersebut.

Penggunaan bakteri pelarut fosfat (BPF) sebagai agen untuk mengurangi serangan patogen mempunyai keunggulan karena selain meningkatkan ketersediaan fosfat karena produksi asam organik dan enzim fosfatase juga berfungsi sebagai agen biokontrol. Kompetisi dapat terjadi apabila dua atau lebih mikroorganisme membutuhkan substrat yang sama dalam bentuk nutrisi, ruangan atau oksigen. Proses antibiosis diduga terjadi apabila cukup nutrisi bagi antagonis. Mengidentifikasi dan mengkuantifikasi metabolit BPF merupakan tujuan dari penelitian ini, selain menguji kemampuannya sebagai agen biokontrol patogen *R. solani* secara *in vitro* di laboratorium dan secara hidroponik pada tanaman kedelai.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Tanah dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian dilakukan dalam tiga tahapan yaitu: pengujian/analisis metabolit (asam organik dan enzim fosfatase), uji antagonis BPF dengan patogen kedelai secara *in vitro*, dan uji penghambatan patogen tanaman secara hidroponik.

Isolasi metabolit sekunder dari BPF *P. putida* 27.4B dan *P. diminuta*

Penetapan Enzim Alkaline Fosfatase

Enzim dalam kultur media. Isolat *P. putida* 27.4B dan *P. diminuta* ditumbuhkan pada medium Pikovskaya cair. Masing-masing cairan medium (250 ml) disterilkan. Setelah steril dan dingin, diinokulasi dengan isolat BPF dan selanjutnya diinkubasi pada 30°C pada shaker dengan putaran 250 rpm selama 7-10 hari. Analisa enzim fosfatase dalam kultur media dilakukan di laboratorium Pascapanen, Balai Besar Litbang Pascapanen Bogor.

Enzim dalam tanah. Tanah netral disteril dengan autoclave sebanyak 10 g diinokulasi dengan 1.0×10^{10} cfu g^{-1} kemudian diinkubasi selama 7 hari. Pada akhir inkubasi ditambah 1 ml substrat solution dan 4 ml working buffer solution, digojok pada suhu 37°C dan diinkubasi lagi selama 1 jam. Ditambahkan 1 ml 0,5M $CaCl_2$ dan 4 ml 0,5M NaOH dan selanjutnya dijadikan 100 ml dengan aquades. Filtrat yang diperoleh diukur intensitas warna kuning dengan Spektrophotometer pada λ 400 nm. Konsentrasi pNP dihitung berdasarkan kurva kalibrasi metode Tabatai (1994):

$$\frac{(S - C).10.100}{\%KL} = \mu g \text{ NP } g^{-1} \text{ KL jam}^{-1}$$

Dimana S = rata-rata sample

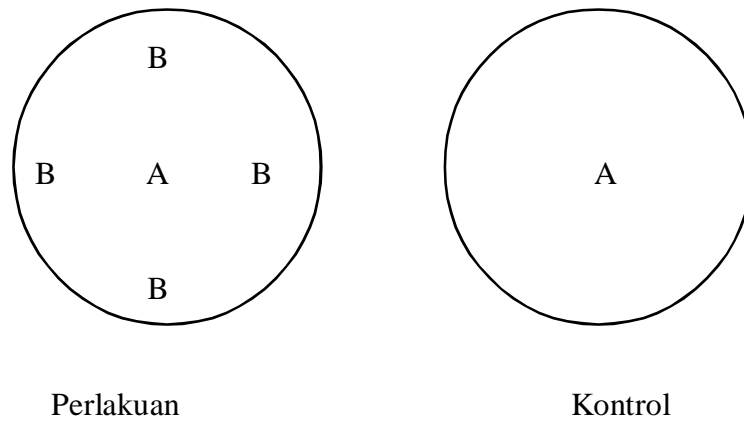
C = rata-rata control

10 = faktor untuk ekstrak larutan

100 = faktor untuk kadar lengas tanah

Penetapan Asam Organik dari BPF

Sejumlah $1,0 \times 10^{10}$ sel bakteri di inokulasikan pada 100 ml medium Pikovskaya batuan fosfat, diinkubasikan selama 3 hari pada suhu kamar pada shaker 100 rpm. Pada akhir inkubasi kultur di sentrifugasi pada putaran 7.500 rpm, pada suhu 25°C selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menentukan kadar asam-asam organik yaitu: asam sitrat, oksalat, format, suksinat, butirrat, asetat dan propionat. Penetapan dilakukan dengan HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Analisis enzim fosfatase dalam kultur media dilakukan di Laboratorium Pascapanen, Balai Besar Litbang Pascapanen Bogor.



A = Jamur *R. solani* ; B = Bakteri pelarut fosfat

Uji Antagonis BPF dengan Patogen Tanaman secara in vitro

Pengujian Penghambatan *R. solani* oleh *P. putida* 27.4B dan *P. diminuta* secara in vitro

Dua isolat bakteri pelarut fosfat (BPF) yaitu: *P. putida* 27.4B (koleksi Lab. Biologi Tanah IPB) dan *P. diminuta* (koleksi Lab. Biologi Tanah UNEJ) yang termasuk kedalam kelompok “fluorescens”, diuji sifat antagonisnya masing-masing serta kombinasinya dengan patogen tanaman *R. solani*.

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan bersama pada media NA dalam cawan petri dengan menempatkan koloni bakteri 2 hari sebelum jamur *R. solani* dengan jarak 3,5 cm, kemudian diinkubasi pada suhu 25-30C. P0 = kontrol; P1 = : *P. putida* 27.4B; P2 = *P. diminuta*, P3 = kombinasi *P. putida* 27.4B, dan *P. diminuta*, pengujian diulang 3 kali.

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga hari ke tujuh setelah inokulasi dengan mengukur diameter koloni jamur. Persentase penghambatan pertumbuhan jamur *R. solani* dihitung berdasarkan rumus :

$$I = \frac{d_1 - d_2}{d_1} \times 100\%$$

I = persentase penghambatan
 d₁ = diameter koloni jamur kontrol
 d₂ = diameter koloni jamur dengan perlakuan

Uji Penghambatan Patogen Tanaman secara Hidroponik

Benih kedelai yang steril dikecambahkan secara aseptik pada suhu 20°C. Benih ditumbuhkan secara hidroponik pada larutan Hoagland dengan menggunakan desikator pyrex pada tabung endorf yang dipotong ujungnya untuk pertumbuhan akar tanaman

Dua isolat BPF masing-masing ditumbuhkan pada media NB. Inokulasi BPS sebesar 10⁹ CFU/ml dilakukan saat tanam. Perhitungan sel dilakukan dengan metode kurva baku dari hasil penelitian sebelumnya (Setiawati, 2003). Inokulasi patogen dilakukan setelah benih tanaman berumur 5 hari dengan skelortia patogen yang ditumbuhkan pada medium PDA dengan 1 skelortia tiap benih tanaman.

Pengamatan tanaman dilakukan hingga benih tanaman berumur 21 hari meliputi: (1) persentase penyakit pra tumbuh, yaitu menghitung benih yang busuk atau tidak tumbuh empat hari setelah tanam, dan (2) persentase penyakit pasca tumbuh/damping off, pengamatan dilakukan mulai 7 HST hingga 21 HST dengan interval waktu pengamatan 7 hari.

Intensitas penyakit dihitung berdasarkan rumus yang ditulis Sastrahidayat (1998):

$$Ti = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Ti = persentase serangan
 a = jumlah bibit yang terserang
 b = jumlah semua bibit yang diamati

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Metabolit Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) *P. putida* 27.4B dan *P. diminuta* dalam Medium

Bakteri pelarut fosfat dalam aktivitasnya menghasilkan metabolit berupa asam-asam organik (Tabel 1) dan enzim *Phosphomonoesterase* (PME) yaitu enzim alkaline phosphatase (Tabel 2), dan antibiotika (Tabel 3).

Dalam aktivitasnya, mikroba pelarut P akan menghasilkan asam-asam organik, diantaranya asam sitrat, glutamat, suksinat, laktat, oksalat, glioksalat, malat, fumarat, tartrat, dan α -ketobutirat (Premono, 1994; Kim *et al.*, 2002; Hu Hongqing *et al.*, 2002). Asam-asam organik yang dihasilkan oleh BPF sangat berperan dalam pelarutan fosfat sukar larut dalam medium maupun dalam tanah melalui mekanisme antara lain: kompetisi anion orthophosphate pada tapak jerapan (Bar-Yosef, 1991), perubahan pH medium, pengikatan logam membentuk logam organik dan chelate oleh ligan organik (Violante *et al.*, 1993). Produksi asam organik akan mempengaruhi pH media. Hal ini sesuai dengan hasil analisis pH media sebelum inokulasi dengan yaitu 6,11 dan setelah inokulasi menjadi 5,03 pada perlakuan inokulasi dengan *P. Putida* 27.4B dan 5,24 pada perlakuan dengan inokulasi *P. diminuta*. Jumlah asam yang dihasilkan mempengaruhi penurunan pH media. Total asam-asam organik yang dihasilkan oleh *P. putida* 27.4B lebih besar dari jumlah asam-asam organik yang dihasilkan oleh *P. diminuta* yaitu sebesar 70,3 mg kg⁻¹ dan 61,9 mg kg⁻¹.

Asam sitrat mempunyai konsentrasi yang cukup besar pada kedua BPF, asam sitrat memineralisasi bentuk P-organik menjadi P-anorganik. Illmer, Barbato dan Schinner (1995) dalam penelitiannya menemukan bahwa spesies *Aspergillus niger* dan

Penicillium simplicissimum mempunyai kemampuan yang tinggi dalam melarutkan P-anorganik karena menghasilkan asam organik yang tinggi terutama asam sitrat. Asam asetat yang dihasilkan oleh *P. putida* dan *P. diminuta* dalam medium cukup tinggi (Tabel 1), karena asam asetat akan banyak dibentuk oleh mikroorganisme dalam kondisi kurang oksigen, sehingga NADH₂ yang terbentuk pada reaksi glikolisis ataupun lintasan metabolisme yang lain akan mereduksi asetil coA menjadi asam asetat.

Ligan organik seperti asam tartrat, oksalat, malat dan sitrat yang mengandung gugus karboksil (COOH), alifatic-OH, fenolik-hidroksil sangat efektif dalam pelarutan mineral dan pembentukan chelat dengan unsur Al, Fe, Ca serta unsur lain dan menurunkan pH media (Violante dan Gianfreda, 2000). Hasil yang sama diperoleh Dye (1995) bahwa asam sitrat dan tartrat efektif mereduksi fiksasi fosfat oleh Fe hidoksida.

Bakteri pelarut fosfat menghasilkan asam-asam organik tersebut melalui proses katabolisme glukosa dalam siklus asam trikarboksilat (TCA), yang merupakan lanjutan reaksi glikolisis. Asam-asam ini merupakan substrat untuk proses anabolisme dalam sintesis asam amino dan makromolekul yang lain, sehingga keluarnya senyawa tersebut belum dapat dipahami dengan baik, mengingat BPF tersebut juga membutuhkan untuk kelangsungan metabolismenya. Diduga akibat refleksi genetic, BPF menghasilkan asam-asam organik ini dalam jumlah berlebih, dan sebagian berdifusi keluar sel karena reaksi keseimbangan osmose (Premono, 1994). Disamping itu, beberapa asam organik ini juga dihasilkan pada proses fermentasi oleh BPF tertentu karena berubahnya lingkungan pertumbuhan aerobik menjadi anaerobik.

Enzim *alkaline phosphatase* merupakan enzim *Phosphomonoesterase* (PME) yang dihasilkan

Tabel 1. Hasil analisis asam-asam organik dalam medium

Jenis asam organik	<i>Pseudomonas putida</i> 27.4B	<i>Pseudomonas diminuta</i>
	Mg kg ⁻¹	
Asam sitrat	11,2	16,1
Asam format	9,1	12,4
Asam suksinat	13,4	6,9
Asam A setat	14,1	8,9
Asam propionat	9,4	4,2
Asam Butirat	1,4	1,0
Asam oksalat	11,7	12,4

Tabel 2. Hasil analisis enzim *alkaline phosphatase*

Enzim <i>alkaline phosphatase</i>	<i>Pseudomonas putida 27.4B</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>
Dalam kultur media	11,71 µg pNP mL ⁻¹ h ⁻¹	24,04 µg pNP mL ⁻¹ h ⁻¹
Dalam tanah	26,27 µg pNP g ⁻¹ h ⁻¹	39,03 µg pNP g ⁻¹ h ⁻¹

sebagian besar oleh mikroorganismenya, sedangkan *acid phosphatase* dan *netral phosphatase* dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi dan sebagian mikroorganismenya (Ponmurugan and Gopi, 2006). Enzim *alkaline phosphatase* terukur pada media yang alkaline sesuai dengan pH medium sebesar 7,49. Untuk mengukur konsentrasi enzim PME sangat tergantung pada pH optimum dari media karena *irreversibly denaturated* pada pH yang sangat masam atau sangat alkalin (Rao *et al.*, 2000; Tabatabai, 1994). Penambahan modified universal buffer (MUB) pada *buffer solutions* merupakan hal penting untuk menjaga aktivitas enzim. Hasil penelitian Vepsäläinen dan Niemi (2002) menunjukkan bahwa pH tanah yang optimal untuk aktivitas enzim phosphomonoesterase (PME) untuk tanah pertanian adalah pH 6,5, hal ini sesuai dengan pH tanah yang digunakan pada penelitian ini untuk mengukur enzim *alkaline phosphatase* dari BPF.

Enzim ini berperan untuk menghidrolisa ester dan anhidrat dari H₃PO₄, serta bertanggung jawab pada proses mineralisasi P organik tanah dan melepaskan P yang dibutuhkan oleh mikroorganismenya dan tanaman. Terdapat korelasi antara konsentrasi enzim phosphatase (aktivitas mikroorganismenya), kandungan bahan organik tanah, pelarutan P dan serapan P tanaman (Zibilske *et al.*, 2000). Ponmurugan dan Gopi (2006) menemukan korelasi positif antara aktivitas enzim fosfatase yang diproduksi *phosphobacteria* strain GP02 dan SP03 dengan kapasitas pelarutan fosfat.

Perbedaan konsentrasi enzim yang dihasilkan oleh *P. putida 27.4B* dengan *P. diminuta* pada tanah kemungkinan karena adanya perbedaan jumlah kompleks Al-OH dalam tanah. *P. putida 27.4B*

menghasilkan asam organik lebih besar sehingga terbentuknya ikatan Al-OH lebih banyak. Adanya kompleks Al-OH akan memberikan recovery yang besar terhadap aktivitas enzim phosphatase sehingga terjadi peningkatan perpindahan molekul-molekul enzim dari larutan tanah menuju *insoluble complexes*. Hasil penelitian Rao *et al.* (1996) menunjukkan kehadiran kompleks Al-OH meningkatkan hingga 48% aktivitas enzim phosphatase dalam *insoluble complexes*.

Kedua isolat BPF mempunyai kemampuan untuk memproduksi metabolit sekunder berupa antibiotik dalam spektrum yang luas yang dapat menekan pertumbuhan mikroorganismenya lain. Kedua isolat BPF yang diuji menghasilkan beberapa jenis antibiotika yang berperan aktif dalam penghambatan patogen (Tabel 3). Menurut Weller *et al.* (2002) bakteri golongan *Pseudomonads* yang bersifat *fluorescens* mempunyai kemampuan memproduksi metabolit sekunder seperti antibiotika, siderophore dan enzim. Trujillo *et al.* (2007) menemukan bahwa BPF *P. fluorescens* PFVB1 selain efektif melarutkan P sukar larut juga efektif sebagai agen biokontrol karena produksi antibiotiknya mempunyai spektrum luas terhadap beberapa patogen bakteri Gram (+) maupun (-), fungi dan yeast.

Beberapa *Pseudomonads* spp. memproduksi siderophore dan mempunyai resistensi yang baik pada beberapa antibiotika seperti ampicilin, kloramfenikol, kanamycin, streptomycin dan tetracycline hingga 200 µg mL⁻¹ medium (Sindhu *et al.*, 1999). Bakteri pelarut fosfat (BPF) *P. aerogenosa* dan *Bacillus* sp. telah diuji resistensinya terhadap beberapa jenis antibiotika yaitu ampicilin, kloramfenikol, penicilin, streptomycin hingga 400 µg mL⁻¹ medium (Setiawati, 2000^a), dan

Tabel 3. Konsentrasi Antibiotika yang dihasilkan oleh *P. putida 27.4B* dan *P. diminuta*

Jenis bakteri	Antibiotika (µg mL ⁻¹)		
	Tetracycline	Oksitetra cycline	Peniclyline
<i>Pseudomonas putida 27.4B</i>	2,55	0,15	0,5
<i>Pseudomonas diminuta</i>	10,31	0,65	0

Tabel 4. Diameter perkembangan jamur patogen hari ke-1 hingga hari ke-8.

Perlakuan	Diameter (mm) pada hari ke- (HIS)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	1,50	7,50	20,83	39,50	5,33	68,67	75,76	79,83
+ <i>P. putida</i> 27.4B	-	-	1,38	8,38	22,50	26,00	31,00	33,25
+ <i>P. diminuta</i>	-	-	1,50	14,0	29,17	37,33	42,33	46,33
+ <i>P. putida</i> 27.4B + <i>P. diminuta</i>	-	-	2,83	15,88	33,00	40,63	46,50	51,50

Keterangan: - = tidak terdapat pertumbuhan hifa jamur patogen

P. putida resisten terhadap antibiotika rifampin, streptomycin, dan tetracycline (Premono *et al.*, 1996).

Uji Antagonis Bakteri Pelarut Fosfat dengan *Rhizoctonia solani* secara in vitro

Proses penghambatan jamur patogen oleh BPF efektif mulai hari ke-2 dan berlanjut hingga hari ke-8 (Tabel 4). Kedua bakteri *Pseudomonas* relative cepat tumbuh (\pm 48 jam, 28°C), sedangkan koloni jamur mulai tumbuh pada hari ke-3 (96 jam, 28°C).

Pseudomonas putida 27.4B dan *P. diminuta* serta kombinasi kedua bakteri mampu menghambat perkembangan jamur patogen *R. solani*. Kehadiran *P. putida* 27.4B menghambat perkembangan jamur patogen *Rhizoctonia solani* paling besar (58,35%), dibanding *P. diminuta* (41,96%) maupun kombinasi kedua BPF (35,49%). Berbeda dengan penghambatan pada bakteri patogen *Ralstonia solanacearum*, kombinasi kedua BPF tersebut menghambat pertumbuhan paling besar yaitu 64,91% (Setiawati, 2002).

Perbedaan efek penghambatan dari masing-masing agen antagonis tersebut membuktikan bahwa masing-masing antagonis mempunyai kemampuan menghasilkan senyawa metabolit yang berbeda jumlah atau potensinya dalam menimbulkan lysis atau nekrotik sel-sel patogen (Tabel 3).

Uji Antagonis Bakteri Pelarut Fosfat dengan *Rhizoctonia solani* secara Hidroponik

Bakteri pelarut fosfat *P. putida* 27.4B dan *P. diminuta* pada uji penghambatan fungsi patogen *R. solani* secara hidroponik ternyata tidak mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan *R. solani*. Persentase serangan penyakit pra tumbuh yang diperoleh diatas 60% (Tabel 5).

Infeksi patogen pada akar dan batang menyebabkan penyumbatan jaringan xylem, sehingga pengangkutan air dan unsur hara ke bagian daun terhambat, sehingga menjadi layu dan kemudian busuk. Penyumbatan jaringan xylem oleh patogen pada awalnya menyebabkan tanaman layu seperti kekurangan air, dan kembali segar sore hari, namun setelah empat hari gejala tersebut tidak dapat pulih kembali seperti semula, karena batang tanaman yang terinfeksi telah menjadi busuk (Sastrahidayat, 1990). Infeksi tanaman yang berumur 5 hari dengan sclerotia patogen ternyata tidak dapat dihambat oleh BPF yang ada dalam medium hidroponik. Hal ini karena didukung oleh pH medium sebesar 7,35 hingga 8,24. Pada kisaran pH ini merupakan pH yang sangat sesuai bagi sclerotium dari *R. solani*. Hasil penelitian dari Sumartini (1999) menunjukkan bahwa pada kisaran pH 7,5 hingga 8,0 jumlah dan berat sclerotium dari

Tabel 5. Persentase serangan penyakit pra tumbuh dan pasca tumbuh.

Perlakuan	% serangan penyakit pra tumbuh (4 hari)	% serangan penyakit pasca tumbuh	
		7 hari	14 hari
Kontrol	85,71	100	100
<i>Pseudomonas diminuta</i> 27.4B	64,29	92,86	92,86
<i>Pseudomonas diminuta</i>	78,57	85,71	89,29

R. solani yang terbesar dibanding pada pH yang lebih masam

Kedua BPF hanya mampu menurunkan tingkat serangan penyakit pra tumbuh maksimal sebesar 21,42% pada hari ke-4 dan serangan penyakit pasca tumbuh hanya 10,71% pada hari ke-14 setelah inokulasi dengan sclerotia *R. solani* masing-masing satu sclerotia pada masing-masing kecambah kedele. Gejala serangan sangat nampak pada kecambah kedele. Pengamatan visual tanaman menunjukkan tingkat serangan yang sangat parah, pada perlakuan kontrol yang tidak diinokulasi dengan BPF, sehari setelah infeksi dengan sclerotium maka kecambah mulai terserang layu, pada hampir semua tanaman.

Kemampuan BPF dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen secara in vitro yang rendah, juga ditunjukkan pada rendahnya kemampuan BPF menghambat secara in vivo di medium hidroponik (Tabel 5). Kemampuan utama dari BPF adalah melarutkan P-sukar larut dan mineralisasi P-organik melalui aktivitas hasil metabolismenya, sehingga kemampuan penghambatan terhadap serangan fungi patogen menjadi rendah. Artinya BPF belum bisa menjadi agen biokontrol penyakit layu akibat serangan *R. solani*.

Populasi BPF pada akhir penelitian menurun secara tajam dari inokulasi awal sebesar 1.10^{13} cfu.mL⁻¹ menjadi 23.10^7 cfu mL⁻¹ untuk *P. putida* 27.4B dan $39,5.10^7$ cfu mL⁻¹ untuk *P. diminuta*. Penurunan ini disebabkan BPF masih beradaptasi dengan medium tumbuhnya yaitu medium Hoagland, adanya kompetisi nutrisi dengan fungi patogen, dan adanya metabolit dari fungi juga mempengaruhi perkembangan BPF.

Pengukuran P-larut dalam medium hidroponik dilakukan pada 14 HSI untuk melihat aktivitas bakteri pelarut fosfat selain penghambatan serangan patogen. Konsentrasi masing-masing BPF sebesar 2,94 mg kg⁻¹ dan 0,46 mg kg⁻¹. Tidak terdapat korelasi yang positif antara populasi dengan aktivitas pelarutan. Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat korelasi negative antara konsentrasi enzim yang dihasilkan dengan pelarutan fosfat. *P. diminuta* menghasilkan enzim *alkaline phosphatase* dalam medium pikovskaya cair maupun dalam tanah lebih besar dibanding *P. putida* (Tabel 2) dan konsentrasi P larut lebih sedikit, dan P-Bray II dalam tanah masam yang diinokulasi oleh *P. diminuta* juga lebih rendah (Setiawati, 2000^b). Hal ini sesuai dengan penelitian Nannipieri *et al.* (1978) yaitu terdapat korelasi negative antara aktivitas enzim

PME dengan ketersediaan P tanah berpasir (sandy soil), dan pada *forest soils*.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa kedua bakteri pelarut fosfat yaitu *Pseudomonas putida* 27.4B dan *Pseudomonas diminuta* teridentifikasi menghasilkan asam-asam organik yaitu asam sitrat, format, suksinat, asetat, propionate, butirrat, dan oksalat dengan total konsentrasi asam organik masing-masing 70,3 mg kg⁻¹ dan 61,9 mg kg⁻¹. Kedua BPF juga menghasilkan enzim alkaline phosphatase pada medium Pikovskaya cair masing-masing *P. putida* 27.4B dan *P. diminuta* sebesar 11,71 µg pNP mL⁻¹ h⁻¹ dan 24,04 µg pNP mL⁻¹ h⁻¹. Konsentrasi enzim ini pada medium tanah lebih besar yaitu 26,27 µg pNP g⁻¹ h⁻¹ dan 39,03 µg pNPb g⁻¹ h⁻¹. Kedua isolat BPF menghasilkan antibiotika tetracycline, oksitetra cycline dan penisilin dengan total konsentrasi 3,2 µg .mL⁻¹ untuk *P. putida* 27.4B dan 10,96 µg mL⁻¹ untuk *P. diminuta*.

Secara in vitro terjadi penghambatan pertumbuhan fungi patogen (*Rhizoctonia solani*) oleh kedua BPF sebesar 58,35% dan 41,96%. Inokulasi dengan BPF menurunkan persentase serangan penyakit pra tumbuh dan pasca tumbuh pada percobaan hidroponik hanya sebesar 10,71% hingga 21,42%. Gejala serangan patogen secara visual dapat diamati mulai 2 hari setelah infeksi hingga tanaman berumur 14 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4081-4085.
- Bar-Yosef. 1991. Root excretions and their environmental effects influence on availability of phosphorus. In: Y Weisel A Eshel, U. Khafkafi, eds. Plant Roots: The Hidden half. Marcel Dekker, New York, pp 529-557
- Carruthers, F. L., A. J. Conner, and H. K. Mahanty. 1994. Identification of a genetic Locus on *Pseudomonas aurefaciens* involved in fungal inhibition. Appl. Environ Microbiol. 60: 71-77.
- Dye, C. 1995. Effect of citrate and tartrate on phosphate adsorption by amorphous ferric hydroxide. Fertilizer Res. 40: 129-134.
- Hu Hongqing, Li Xueyuan, and He Jizheng. 2002. Effects of organic acids on desorption of phosphate from the surfaces of aluminum hydroxide and complexes.

- Word Congress Soil Science, 17th. Thailand. Symposium 47, paper 170.
- Illmer, P.A., Barbato, and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27 (3): 265-270.
- Khan, M. R., S. M. Khan, F. A. Mohiddin, and T. H. Askary. 2007. Effect of certain phosphate-solubilizing bacteria on root-knot nematode disease of mungbean. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 341–346. Springer. The Netherlands.
- Kim, K.Y., H. Hwangbo., R.D. Park., K.Y. Seong., Y.W. Kim., B.K. Park, and H.B. Krishnan. 2002. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. Word Congress Soil Science, 17th. Thailand. Symposium 06, paper 919.
- Klopper, J. W. 1993. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents. In (B. Metting, Jr (Ed). *Soil Microbial Ecology*. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 255-274.
- Nannipieri, P., R.L. Johnson, and E.A.B. Paul. 1978. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biol Biochem* 10: 223-228.
- Ponmurugan, P., and C. Gopi. 2006. *In vitro* production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *Afri. J. Biotech.* 5(4): 348-350.
- Premono, M.E. 1994. *Jasad Renik Pelarut Fosfat: Pengaruhnya terhadap P-tanah dan Efisiensi Pemupukan P Tanaman tebu*. Disertasi Doktor. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor
- Premono, M.E., A.M. Moawad and P.L.G. Vlek. 1996. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Ind. Journal of Crop Sci.* 11 (1): 13-23.
- Rao, M.A., L. Gianfreda, A.A. Palmiero, and Violante. 1996. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Sci* 161: 751-760.
- Rao, M.A., A. Violante and L. Gianfreda. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1007-1014.
- Sastrahidayat, I.R. 1998. *Penuntun Praktikum Pengendalian Hama Terpadu*. Universitas Brawijaya Malang. Program Pasca Sarjana. 24 p.
- Sastrahidayat, I.R. 1990. *Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Usaha Nasional Press. Surabaya.
- Setiawati, T.C. 2000^a. Viabilitas dan kepekaan mikroba pelarut P terhadap beberapa media pembawa dan antibiotika. Laporan Penelitian Universitas Jember.
- Setiawati, T.C. 2000^b. Viabilitas Mikroba Pelarut Fosfat dalam Media Pembawa Cair dan Serta Efektifitasnya dalam Meningkatkan ketersediaan P. Laporan Penelitian Matching-Grand Asian Development Bank (ADB). Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Setiawati, T.C. 2002. Uji Antagonistik antara Bakteri Pelarut Fosfat dengan *Pseudomonas solanacearum* secara in Vitro dan pengaruhnya pada tanaman Tembakau. Laporan Penelitian Dosen Muda. Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Setiawati, T.C. 2003. Viabilitas Bakteri Pelarut Fosfat pada Kombinasi Media Senyawa Humik dan Zeolit serta Uji Kemampuan Pelarutan P-Tanah. Laporan Penelitian Dosen Muda. Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Sindu, S.S., S.K. Gupta, and K. R. Dadarwal. 1999. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of growth of green gram (*Vigna radiata*). *Biol. Fertil. Soils* 29: 62-68.
- Sumartini. 1991. Daya tahan *Sclerotium rolfsii* dan *Rhizoctonia solani* pada lingkungan berbeda. *Dalam Edisi Khusus Balitkabi* 13: 262-269.
- Tabatabai, M.A. 1994. Soil enzymes, In Alef, K and P, Nannipieri (eds) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Soc. of America. Madison, WI. pp 775-833.
- Trujillo, M.E. E. Vela'zquez, S. Migue'lez, M.S. Jimenez, P.F. Mateos, and E. Mart'inez-Molina. 2007. Characterization of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that solubilizes phosphates in vitro and produces high antibiotic activity against several microorganisms. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 265–268. Springer. The Netherlands.
- Vepsalainen, M. and R. M. Niemi. 2002. pH optima of enzyme activities in different soils. Symposium no. 12. 17th WCSS, 14-21 August 2002. Thailand.
- Violante, A. and L. Gianfreda. 2000. Role of Biomolecules in the formation and reactivity toward nutrients and organics of variable charge minerals and organomineral complexes in soil environment. *Soil Biochem.* 10: 207-270.
- Violante, A., L. Gianfreda, and P. Violante. 1993. Effect of prolonged aging on the transformation of short-range ordered aluminium precipitation products formed in the presence of organic and inorganic ligands. *Clays Clay miner* 41: 353-359.
- Weller, D.M., J.M. Raijmakers., B.B.M. Gardener, and L.S. Tomashow. 2002. Microbial population responsibility for specific soil suppressive ness to plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309-348.
- Zibilske, L.M., J.R. Smart, J.M. Bradford, and L.R. Martinez. 2000. Phosphorus Dynamics and Biochemical Changes in Soil Managed with Conservation Tillage Integrated Farming and Natural Resources Research Unit.