

PENGIMBASAN KETAHANAN PISANG TERHADAP PENYAKIT LAYU BAKTERI (*Ralstonia solanacearum*) DENGAN *PSEUDOMONAS CEPACIA*

Induced Resistance of Banana to Bacterial Wilt (Ralstonia solanacearum) using Pseudomonas cepacia

Wilhelmina Rumahlewang¹, Christanti Sumardiyono¹, Siti Subandiyah¹ dan S.M. Widyastuti²

Program Studi Fitopatologi
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith.), have been an important disease of banana plants. The objective of this study was to know the ability of *P. cepacia* in inducing resistance and salicylic acid content on phytoalexin extract of banana plants.

The result showed that resistance of Ambon Kuning cultivar could be induced by viable and extraselulair protein of *P. cepacia*. The induced banana plants had lower disease intensity than uninduced plants.

Salicylic acid content in phytoalexin extract from banana was induced by extraselulair protein of *P. cepacia* was 41,41 ppb.

Keywords: *induce resistance – salicylic acid.*

PENGANTAR

Mekanisme pengendalian hayati yang didasarkan pada mikrobia antagonis dapat secara langsung (kompetisi dan antibiosis) atau tidak langsung dengan ketahanan terimbas dari inang. Bakteri yang bersifat antagonis terhadap *R. solanacearum* dapat diisolasi dari berbagai sumber, misalnya tanah *suppressive* dan *rhizosphere* tanaman inang (Trigalet dan Trigalet, 1984). *Pseudomonas cepacia* (Sinonim *Burkholderia cepacia*) dapat dipakai sebagai antagonis dalam pengendalian hayati. *P. cepacia* merupakan suatu patogen penyebab *sour skin* pada bawang. Herbar dan Lumsden (1999) melaporkan bahwa *P. cepacia* isolat asal rizosfer jagung memiliki aktifitas antifungal menekan jamur patogen yang berspektrum luas. Pirrolnitrin dilaporkan sebagai metabolit yang umumnya berperan terhadap aktivitas antifungal *B. cepacia* (sinonim *P. cepacia*) (Burkheld *et al.* (1994). Sebaliknya strain ATCC 25416, suatu patogen bawang, tidak menghasilkan pirrolnitrin,

1) Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

2) Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

tetapi menghasilkan senyawa antifungal berupa siderofor dan antibiotik *chlorinated phinylpyrrole*, dan enzim hydrolytic β -1.3-glucanase.

Beberapa penelitian menyimpulkan bahwa asam salisilat (SA = *Salicylic acid*) merupakan satu tanda terjadinya aktivasi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen (Conrath *et al.*, 1996), di mana ditemukan dalam tanaman tembakau terjadi peningkatan kadar asam salisilat endogenous dihubungkan dengan aktivasi gen-gen penanda *pathogenesis-related protein* (protein- PR), seperti PR-1, dan mempertinggi ketahanan terhadap *tobacco mosaic virus*.

Bakteri *P. cepacia* (Pc-C6) yang tergolong *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) diharapkan dapat sebagai egensia pengimbas ketahanan pisang terhadap penyakit layu bakteri dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan *P. cepacia* sebagai agensia pengimbas ketahanan pisang terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum* dan kandungan asam salisilat dalam ekstrak fitoaleksin yang dihasilkan tanaman pisang.

CARA PENELITIAN

Sumber isolat bakteri. Dua isolat bakteri, yaitu bakteri *R. solanacearum* isolat virulen dan bakteri *P. cepacia* isolat Pc-C6 merupakan koleksi Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Tanaman. Tanaman pisang Ambon Kuning, berumur 2 bulan yang berasal dari kultur jaringan.

Isolasi Protein Ekstraseluler. Isolasi protein ekstraseluler bakteri dilakukan dengan metode De Boer dan Schaad (1990).

Pengimbasan ketahanan. Inokulasi dilakukan dengan menyuntikkan 10 ml protein ekstraseluler bahan *P. cepacia* pada pangkal batang tanaman pisang dengan konsentrasi 300 mg/ml per tanaman. Inokulasi *R. solanacearum* dilakukan satu minggu setelah pengimbasan dengan protein ekstraseluler dari bakteri pengimbas, yaitu sebanyak 10 ml suspensi bakteri dengan kerapatan 10^8 CFU/ml (absorbansi = 0,6) disiramkan pada daerah perakaran tanaman pisang.

Ekstraksi fitoaleksin. Ekstraksi fitoaleksin dilakukan dengan metode ekstraksi senyawa fenol menurut Keen *et al. cit.* Nonaka dan Matsuzaki (1976) yang dimodifikasi. Analisis kualitatif kandungan asam

spektrofotometer-UV (1 = 200-400 nm) dan secara kuantitatif dilakukan dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Uji in-vitro penghambatan ekstrak fitoaleksin terhadap *R. solanacearum*. Sebanyak 0,1 ml kultur bakteri *R. solanacearum* (absorbansi = 0,6) disiapkan dalam cawan Petri berisi media CPG. Kertas filter steril berdiameter 5 mm dicelupkan dalam ekstrak fitoaleksin 0,2% dan diletakan ditengah-tengah cawan Petri berisi kultur bakteri tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengimbasan Ketahanan Pisang Terhadap Penyakit Layu (*R. solanacearum*)

Hasil pengamatan ketahanan menunjukkan bahwa *P. cepacia* dan protein ekstraselulernya mampu mengimbas ketahanan. Gejala penyakit mulai tampak pada umur tanaman 2-3 (13 hari) minggu setelah inokulasi (MSI), dengan rata-rata intensitas serangan 9,38% pada umur tanaman 3 MSI dan menjadi 93,75% pada umur tanaman 4 MSI termasuk tingkat sangat rentan dengan rata-rata intensitas serangan penyakit layu bakteri pada umur tanaman 4 MSI adalah 91,23%. Pengaruh pengimbasan ketahanan terhadap persentase daun sakit dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pengimbasan ketahanan terhadap persentase daun sakit dan intensitas serangan pada minggu ke-4 setelah inokulasi

Perlakuan*	Rata-rata persentase daun sakit(%)**		Rata-rata intensitas serangan (%)**	Tingkat ketahanan
	Data asli	Data transformasi $Y = \sin^{-1} \sqrt{x+0,5}$		
K ⁺	91,23	73,28 a	93,75	SR
P-Pc-C6xRs	0	4,05 b	0	T
Pc-C6xRs	0	4,05 b	0	T
Pc-C6	0	4,05 b	-	-
K ⁻	0	4,05 b	-	-

Keterangan :

* = P-Pc-C6xRs = Protein ekstraseluler Pc-C6xR. *solanacearum*; Pc-C6xRs = bakteri hidup Pc-C6xR. *Solanacearum*; Pc-C6 = bakteri hidup Pc-C6; K⁺ = *R. solanacearum*; dan K⁻ = tanpa perlakuan.

**= Rata-rata dari 4 ulangan

Pelukaan akar yang terjadi pada saat inokulasi suspensi bakteri *R. solanacearum* merupakan jalan bagi bakteri ini masuk dalam jaringan tanaman dan bergerak dengan cepat dalam pembuluh tanaman dengan mengikuti aliran air. Bakteri *R. solanacearum* menyerang bagian pengangkutan (xylem) sehingga menyebabkan terhambatnya transportasi air. Efisiensi penggunaan air berkurang dan menyebabkan kelayuan daun. Semangun (1996) mengatakan bahwa kelayuan karena bakteri *Pseudomonas solanacearum*, *Fusarium* dan *Verticillium* disebabkan karena patogen tersebut berada dalam berkas pembuluh, sehingga berkas pembuluh tersumbat secara fisik.

Analisis Ekstrak Fitoaleksin

Dari hasil analisis kualitatif terhadap ekstrak fitoaleksin dengan spektrofotometer-UV dari semua ekstrak fitoaleksin menunjukkan panjang gelombang yang mirip dengan larutan standar asam salisilat yaitu 230 nm dan hasil analisis kuantitatif dengan HPLC terhadap larutan standar asam salisilat menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan luas puncak area merupakan hubungan linier, dengan $R_t = 4,911$ dan persamaan regresi $Y = -560,38 + 825,812x$, dan $r = 0,9897$. Kandungan asam salisilat dalam keseluruhan ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2:

Tabel 2. Kandungan asam salisilat dalam ekstrak fitoaleksin tanaman hasil pengimbasan ketahanan tanaman

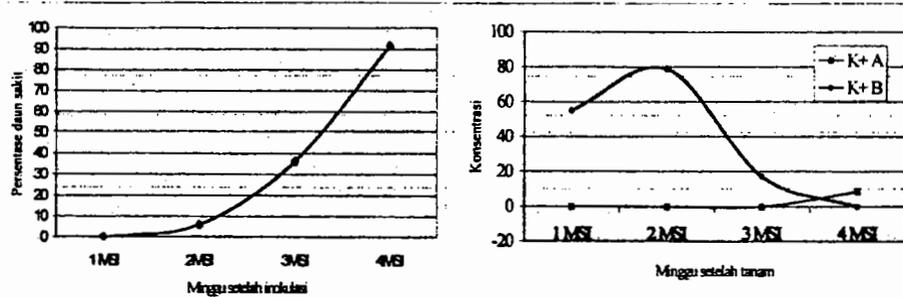
Perlakuan*	Persentase daun sakit (%)				Konsentrasi asam salisilat (ppb)			
	1MSI**	2 MSI	3 MSI	4 MSI	1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
P-Pc-C6xRs A	0	0	0	0	0	19,45	6,05	0
P-Pc-C6xRs B	0	0	0	0	0	0	0	41,14
Pc-C6xRs A	0	0	0	0	0	0	0	0
Pc-C6xRs B	0	0	0	0	0	0	9,85	0
Pc-C6 A	0	0	0	0	0	0	0	7,02
Pc-C6 B	0	0	0	0	20,64	61,42	0	0
K ⁺ A	0	6,07	36,11	91,23	0	0	0	8,51
K ⁺ B	0	6,07	36,11	91,23	140,73	210,79	37,59	0
K ⁻ A	0	0	0	0	0	6,552	0	0
K ⁻ B	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan : * P-Pc-C6xRs = Protein ekstraseluler *P. cepacia*-C6x*R. solanacearum*; Pc-C6xRs = *P. cepacia*x*R. solanacearum*; Pc-C6 = bakteri hidup Pc-C6; K⁺ = *R. solanacearum*; dan K⁻ = tanpa perlakuan.

Hasil analisis ekstrak fitoaleksin dari akar dan batang tanaman pisang menunjukkan bahwa pengimbasan ketahanan dengan penyuntikan protein ekstraseluler bakteri pengimbas berpengaruh terhadap asam salisilat yang dihasilkan oleh tanaman, yaitu pada umur tanaman 4 MSI. Kandungan asam salisilat pada bagian batang tanaman pisang dengan perlakuan dengan protein ekstraseluler *P. cepacia* 41,14 ppb.

Ekstrak fitoaleksin yang diperoleh diduga mengandung asam salisilat. Asam salisilat yang terdeteksi terkandung dalam ekstrak fitoaleksin. Fitoaleksin adalah senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh jaringan inang sebagian tanggapan terhadap invasi patogen Semangun (1996). Senyawa ini terakumulasi sampai pada suatu aras yang menghambat perkembangan patogen. Beberapa penelitian menyimpulkan bahwa asam salisilat (SA = *Salicylic acid*) merupakan satu tanda penting untuk aktivasi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen (Conrath et al., 1996), contohnya pada tanaman tembakau terjadinya peningkatan kadar asam salisilat endogenous dihubungkan dengan aktivasi gen-gen *pathogenesis-related* (PR), seperti PR-1, yang mempertinggi ketahanan terhadap *tobacco mosaic virus*. Beber et al., (2000) dalam penelitian pada tanaman barley membuktikan bahwa asam salisilat dan tiruannya, yaitu asam 2,6-dichloroisomicotinic (DCINA) dan benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothiotic (BTH) lebih berpotensi sebagai penginduksi terhadap ekspresi gen dan ketahanan.

Asam salisilat pada tanaman yang diimbas dengan protein ekstraseluler bakteri terdeteksi pada bagian batang (perlakuan P-Pc-C6xRsB4). Hal ini merupakan tanggapan tanaman terhadap pengimbasan yang diberikan karena pengimbasan dilakukan dengan penyuntikan pada bagian pangkal batang tanaman. Asam salisilat dapat juga terdeteksi pada perlakuan Pc-C6xRsB3, Pc-C6B1, dan Pc-C6B2. Hal ini merupakan tanggapan tanaman terhadap pelukaan akar yang dilakukan pada saat pemberian suspensi bakteri hidup Pc-C6. Tingginya kandungan asam salisilat pada tanaman pisang dengan perlakuan K⁺ diduga karena pada umur tanaman 1 MSI tanaman memberikan tanggapan *R. solanacearum*. Sedangkan pada umur pada umur tanaman 4 MSI kandungan asam salisilat tidak terdeteksi karena jaringan tanaman telah rusak dan bakteri telah mampu berkembang dalam jaringan tanaman dan menimbulkan penyakit (Gambar 1).



Gambar 1. Hubungan persentase daun sakit dan kandungan asam salisilat dalam ekstrak fitoaleksin (kiri : persentase daun sakit pada perlakuan K⁺ dan kanan : kandungan asam salisilat pada perlakuan K⁺ akar dan K⁺ batang)

Dari hasil analisis kandungan asam salisilat dalam ekstrak fitoaleksin menunjukkan bahwa asam salisilat terdapat juga pada tanaman yang tidak diinfeksi, contohnya pada tanaman dengan perlakuan K⁻A2. John *et al.*, (1996) menjelaskan bahwa asam salisilat merupakan senyawa kimia yang berperan sebagai aktivator dalam ketahanan perolehan (SAR, *Systemic acquired resistance*), dan selanjutnya menetapkan sistem genetik untuk tahap elucidasi berikutnya yang menandakan adanya SAR. Baru-baru ini, marker gen yang disebut gen SAR telah diidentifikasi yang diinduksi erat berkorelasi dengan SAR yang sebelumnya ada dalam jaringan yang tidak terinfeksi, dimana analisis terhadap protein SAR menunjukkan bahwa banyak untuk *protein-PR*, yang secara jelas diidentifikasi sebagai *novel protein* terakumulasi sebelum infeksi TMV pada daun tembakau.

Di samping pengaruh pengimbasan secara kimia menurunnya intensitas serangan bakteri *R. solanacearum* disebabkan adanya kompetisi antara bakteri antagonis dengan patogen dalam rizosfer tanaman pisang. Pemberian bakteri hidup dari bakteri *P. cepacia* pada daerah rizosfer mengakibatkan terjadi kompetisi (makanan dan ruang) dan metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh bakteri antagonis, sehingga pada saat diberikan bakteri patogen *R. solanacearum*, bakteri ini akan sulit untuk berkembang menyaingi bakteri *P. cepacia* yang telah lebih dulu berkembang di daerah rizosfer tanaman.

Daya Hambat Ekstrak Fitoaleksin Terhadap *R. solanacearum*

Tidak ada hubungan yang jelas antara penghambatan ekstrak fitoaleksin dengan akumulasi asam salisilat. Perlakuan K⁻A3 yang

asam salisilat tidak terdeteksi pada perlakuan K⁻A3. Demikian juga dengan perlakuan protein ekstraseluler *P. cepacia* memiliki kandungan asam salisilat 41,14 ppb tetapi zone penghambatan yang dibentuk hanya 15,74 mm. Kemampuan menghambat dari ekstrak fitoaleksin terhadap perkembangan bakteri *R. solanacearum* kemungkinan disebabkan karena adanya senyawa lain dalam ekstrak fitoaleksin yang menghambat perkembangan koloni *R. solanacearum*.

KESIMPULAN

1. Protein ekstraseluler dan bakteri hidup *P. cepacia* (Pc-C6) mampu mengimbas ketahanan tanaman pisang Ambon Kuning, yang ditandai dengan penurunan persentase daun sakit yaitu tetap 0% sampai umur tanaman 4 MSI (minggu setelah inokulasi).
2. Pengimbasan ketahanan pada tanaman pisang Ambon Kuning dapat dilihat dengan meningkatnya kandungan asam salisilat pada tanaman yang diimbas dengan protein ekstraseluler bakteri *P. cepacia*.

DAFTAR PUSTAKA

- Beber, K., Jarosch, B., Langen, G., Kogel, K.-H. 2000. Expression Analysis on Genes Induced in Barley After Chemical Activation Reveals Distinct Disease Resistance Pathways. *Mol. Plant Pathol.* 1(5).
- Burkheld, K.D, D.A. Schisler, and P.J. Slininger. 1994. Pyrrolnitrin Production by Biological Control Agent *Pseudomonas cepacia* B37w in Culture in Colonized Wounds of Potatoes. *Apl-Environ-Microbiol.*, Vol 60 (6) : 2031 - 2039.
- Conrath, U. Z. Chen, J. Durner, J. Hening, P. Sanchez-Casas, H. Silva, J. Ricigliano and D.F. Klessig. 1996. The Salicylic Acid Signal for the Activation of Plant Disease Resistance : Induction, Modification, Perception, and Transduction. *Dalam* H. Lyr, P.E. Russell and H. D. Sister. 1996 : *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Intercept Ltd. Andover : 467-473.
- De Boer, S dan N.W. Schaad. 1990. Preparation of Antigens, Bacteria. *Dalam* R. Hampton, E. Ball and S. de Boer (eds) : *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens* : 27-29.
- Herbar, K. P and D.R. Lumsden, 1999. Biological Control of Seedling Diseases. *dalam* R.H. Franklin and J.M. Julius (eds.) *Biopesticides : Use and Delivery*. Humana Press. Tonawa, New Jersey : 104 - 135.
- John. A. R., U.H. Neuenschwander, M.G. Willits, A. Molina, S. Henry-York and M.D. Hunt. 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*. Vol 8. No.10.1809-1819.

- Nonaka, F and N. Matsuzaki. 1976. Production of Hydroxy Phaseolin in Soybean Leaves Infected with the Blight Bacterium, *Xanthomonas phaseoli* var. *sojae* and it's Antifungal Action. *Agric Bull.* No. 40:2.
- Semangun, H. 1996. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta : 192-193.
- Trigalet, A. P. F and D. D Trigalet. 1984. Biological Control of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum* : State of the Art and Understanding. Dalam A. C. Hayward and G.I. Hartnan (eds.) *Bacterial Wilt : The Disease and It's Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International Taiwan : 225-233.