

IDENTIFIKASI ANTAGONIS DARI *Xanthomonas campestris* YANG DIISOLASI DARI RHIZOSPHERE PERKEBUNAN BROKOLI (*Brassica oleracea* var. *italica*) DI DESA KEMBANG MERTA, KABUPATEN TABANAN, BALI

IDENTIFICATION OF ANTAGONISTS OF *Xanthomonas campestris* ISOLATED FROM RHIZOSPHERE ZONE OF BROCCOLI FARM AT KEMBANG MERTA VILLAGE, TABANAN, BALI

Nadya Treesna Wulansari¹, Yan Ramona^{1,2}, Meitini Wahyuni Proborini^{1*}

¹*Program Studi Magister Biologi, Program Pascasarjana, Universitas Udayana, Bali*

²*UPT Laboratorium Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana, Bali*

**Email: pmeitini@yahoo.com*

INTISARI

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jamur dan bakteri yang bersifat antagonis terhadap *Xanthomonas campestris*, dari zona *rhizosphere* tanaman brokoli. Sampel tanah diambil dari areal pertanian brokoli di Desa Kembang Merta, Tabanan, Bali. Isolasi dan identifikasi antagonis dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Universitas Udayana. Sebanyak masing-masing dua isolat jamur (*Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma viride*) dan isolat bakteri (*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.) antagonis yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi agen biokontrol berhasil diidentifikasi dalam penelitian ini.

Kata kunci: Brokoli, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., Bali.

ABSTRACT

The main objectives of this research were to isolate and identify antagonists of *Xanthomonas campestris* from *rhizosphere* zone of broccoli plants. Soil samples were collected from broccoli farm located at Kembang Merta village, Tabanan, Bali. Isolation and identification of the antagonists were conducted at the Laboratory of Microbiology, Udayana University. Two fungal (*Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*) and two bacterial (*Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.) antagonists potentially to be developed as biocontrol agents of *Xanthomonas campestris* were successfully identified in this research.

Key words: Broccoli, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., Bali.

PENDAHULUAN

Salah satu penyebab menurunnya produksi brokoli adalah meningkatnya serangan penyakit busuk hitam yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas campestris* Dows (Rukmana, 1994). Tanaman yang terinfeksi akan menunjukkan gejala munculnya bercak

coklat kehitam-hitaman pada daun, batang, tangkai bunga, dan akhirnya mengering, sehingga tanaman tidak dapat dipanen. Untuk menanggulangi masalah penyakit busuk hitam ini, petani brokoli di Desa Kembang Merta mengandalkan pestisida kimia. Bila digunakan dalam jangka waktu lama dan secara berlebihan,

pestisida kimia ini dapat berdampak buruk bagi kesehatan manusia dan lingkungan.

Penelitian ini mengisolasi dan mengidentifikasi musuh alami (mikroba antagonis) dari penyebab penyakit busuk hitam pada tanaman brokoli untuk meminimalkan efek negatif dari penggunaan pestisida kimia. Tujuan utama penelitian ini adalah untuk memperoleh mikroba antagonis potensial yang dapat dikembangkan menjadi agen biokontrol, sehingga dapat dikembangkan metode alternatif penanggulangan serangan *Xanthomonas campestris* pada tanaman brokoli yang dibudidayakan di areal pertanian Kembang Merta, Kabupaten Tabanan, Bali.

MATERI DAN METODE

Pengambilan Sampel

Sampel tanah dari delapan titik zona *rhizosphere* tanaman brokoli di Desa Kembang Merta diambil sebanyak masing-masing 100 g secara aseptik dan dimasukkan ke dalam kantong plastik steril. Tanah sampel ini kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana untuk dilakukan isolasi dan identifikasi mikroba antagonis yang menempel pada sampel tanah.

Isolasi Mikroba Antagonis

Mikroba antagonis diisolasi dengan metode pengenceran dan sebar (*dilution and spread plate method*) pada medium *Potato Dextrose Agar* (untuk jamur antagonis) dan *Nutrient Agar* (untuk bakteri antagonis), seperti yang dilakukan oleh Suryanti *et al.* (2013). Aktivitas antagonisme koloni yang tumbuh dikenali dari hasil *dual culture assay* yang mengadopsi metode yang dilaporkan oleh Ramona (2003).

Identifikasi Mikroba Antagonis

Jamur dan bakteri yang menunjukkan aktivitas antagonisme dengan persentase hambatan terbesar terhadap *Xanthomonas campestris*, diidentifikasi sampai level genus atau spesies, berdasarkan ciri-ciri morfologi dan karakteristik metabolismenya. Identifikasi

jamur antagonis dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna koloni, struktur spora, hifa, konidiofor, dan konidiana. Hasilnya dicocokkan dengan karakteristik yang tertera pada buku *Fungi and Food Spoilage* (Pitt dan Hocking, 1997). Sementara itu, bakteri antagonis yang berhasil diisolasi, diuji karakteristik metabolismenya, seperti uji katalase, indol, dan kemampuannya memfermentasi gula-gula (glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa). Selain itu, motilitasnya pada medium SIM, reaksinya terhadap pewarnaan gram, dan pewarnaan spora juga dilakukan. Hasil yang diperoleh dicocokkan dengan karakteristik bakteri yang tertera pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition* (Holt *et al.*, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

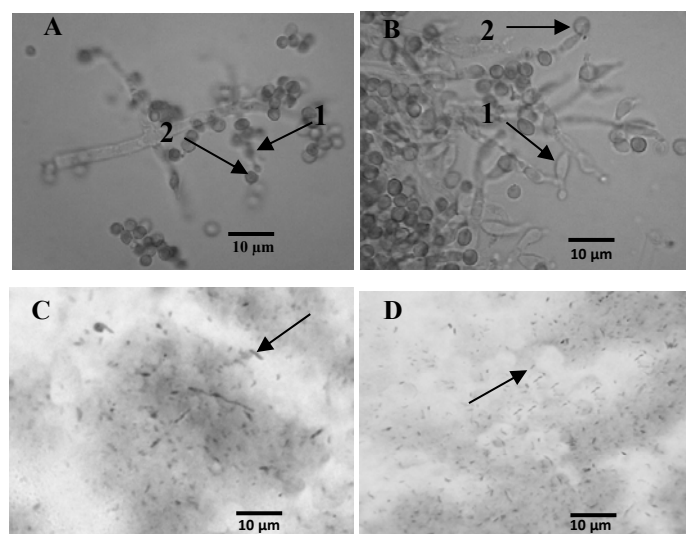
Dua isolat jamur dan bakteri antagonis yang menunjukkan aktivitas antagonisme dengan persentase hambatan terbesar yaitu *Trichoderma harzianum* (41,11±5,84%), *Trichoderma viride* (24,07 ±3,76%), *Bacillus* sp. (16,11±5,61%) dan *Pseudomonas* sp. (30,92±3,17%) atau paling potensial untuk dikembangkan menjadi agen biokontrol, berhasil diisolasi dari *rhizosphere* tanaman brokoli yang dibudidayakan di sentra pertanian Kembang Merta, Kecamatan Baturiti, Kabupaten Tabanan, Bali. Berdasarkan karakteristik morfologinya secara makroskopis dan mikroskopis yang tertera dalam buku *Fungi and Food Spoilage* (Pitt dan Hocking, 1997), jamur-jamur antagonis tersebut teridentifikasi sebagai *Trichoderma harzianum* (Gambar 1A) dan *Trichoderma viride* (Gambar 1B). Isolat *Trichoderma harzianum* memiliki karakteristik koloni berwarna hijau muda keputihan pada hari ke-3, konidiofor bercabang dengan filid berbentuk oval ramping menyerupai botol, konidiana berbentuk bulat, oval dan berwarna hijau gelap ukuran 2,8-3,2 µm. Sementara itu, isolat *Trichoderma viride* memiliki laju pertumbuhan yang lebih lambat daripada isolat *Trichoderma harzianum* yang ditunjukkan dengan diameter koloni *Trichoderma viride* (7,5 cm) dan *Trichoderma harzianum* (8,5 cm) pada hari ke-2. Karakteristik lain *Trichoderma viride*

adalah koloni berwarna hijau muda pada hari ke-2 dan menjadi hijau tua pada hari ke-4 dengan konidiofor bercabang, fialid ramping, bentuknya tidak beraturan, ukuran konidia lebih besar dari *Trichoderma harzianum* yaitu 3,5-4,0 μm . Karakteristik tersebut sejalan dengan yang tertera dalam buku *Fungi and Food Spoilage* (Pitt dan Hocking, 1997).

Trichoderma merupakan jamur *filamentous* (*Deuteromycetes*) yang sebarannya sangat luas dan hidup di daerah *rhizosphere* tanaman (Tapwal *et al.*, 2011). *Trichoderma harzianum* menghasilkan enzim selulase, kitinase, dan proteinase yang banyak diklaim berperan dalam aktivitas antagonismenya terhadap jamur patogen (Soesanto, 2008). Selain enzim-enzim tersebut, Saksirirat *et al.* (2009) melaporkan bahwa *Trichoderma harzianum* memiliki aktivitas enzim kitinase dan β -1,3-glukanase yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pada tanaman tomat. Kemampuan *Trichoderma viride* untuk menghasilkan enzim hidrolitik lain, seperti $\text{exo-}\beta$ -1,4 glukanase, $\text{endo-}\beta$ -1,4 glukanase dan β -1,4 glukosidase dan enzim xyloglukanolitik juga pernah dilaporkan oleh Tribak *et al.* (2002) dan Yasmin *et al.* (2013). Peneliti lain, Smitha *et al.* (2014) dan Soesanto (2008) menyatakan bahwa *Trichoderma viride* juga menghasilkan berturut-turut enzim proteinase dan senyawa

antibiotika seperti peptida suzukalisin yang mempunyai aktivitas antibakteri.

Dalam penelitian ini, dua isolat bakteri antagonis potensial juga berhasil diisolasi dan diidentifikasi. Kedua isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp., berdasarkan pada karakteristik spesifiknya yang tertera dalam buku *Bergey's Manual Determinative Bacteriology 9th Edition* (Holt *et al.*, 1994). Isolat *Bacillus* sp. memiliki ciri-ciri berbentuk batang berantai ukuran 0,6-2,0 x 1,2-4,0 μm , gram positif, memiliki endospora, reaksi positif terhadap pengujian katalase, motil pada medium SIM, memfermentasi glukosa, maltosa, sukrosa dan reaksi negatif terhadap uji indol serta tidak menunjukkan perubahan warna pada medium. Sementara itu, isolat *Pseudomonas* sp. memiliki bentuk batang tunggal ukuran 0,5-1,0 x 1,5-3,0 μm , gram negatif, tidak memiliki endospora, menunjukkan reaksi positif pada uji katalase, motil pada medium SIM, memfermentasi glukosa, maltosa, sukrosa dan reaksi negatif terhadap uji indol serta menunjukkan warna biru berpendar pada medium setelah disinari dengan UV. Bentuk sel dari *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan gram ditunjukkan berturut-turut pada gambar 1C dan 1D.



Gambar 1. Foto mikroskopis jamur dan bakteri antagonis
Keterangan: (A). *Trichoderma harzianum*, (B). *Trichoderma viride*,
(1) Fialid (2) Konidia. (C). *Bacillus* sp., (D). *Pseudomonas* sp.

Aktivitas antagonisme kedua bakteri tersebut secara *in vitro* atau dalam percobaan skala rumah kaca telah banyak dilaporkan. Monteiro *et al.* (2005), misalnya melaporkan bahwa bakteri *Bacillus* sp. dapat menghasilkan senyawa surfaktan yang berupa polipeptida dan senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Sementara itu, *Pseudomonas* dilaporkan oleh Hanudin *et al.* (2010) dan Addy (2008), mempunyai kemampuan untuk menghasilkan antibiotika, enzim litik (protease, selulase, glukonase) dan siderofor yang berperan penting dalam aktivitas antagonismenya terhadap patogen tanaman. Beberapa spesies *Pseudomonas* juga mampu menghasilkan antibiotika yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen tanaman (Bhattacharjee *et al.*, 2014). Bakteri ini dapat diisolasi dengan mudah dari *filosfer*, *rhizosphere* dan *rhizoplane* (Addy, 2008; Chakravarty *et al.*, 2012; Soesanto, 2008).

SIMPULAN

Dua isolat jamur (*Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma viride*) dan dua isolat bakteri (*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.) antagonis potensial berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari zona *rhizosphere* tanaman brokoli yang dibudidayakan di sentra pertanian Kembang Merta, Kecamatan Baturiti, Kabupaten Tabanan, Bali.

KEPUSTAKAAN

Addy, H.S. 2008. Aktivitas *Pseudomonas* Pendar Fluor dalam Mengendalikan Penyebab Penyakit Patik (*Cercospora nicotianae*) pada Tembakau. Jurnal Pengendalian Hayati. 1(2): 98-103.

Bhattacharjee, R. and U. Dey. 2014. An Overview of Fungal and Bacterial Biopesticides to Control Plant Pathogen Disease. African Journal of Microbiology Research. 8(17): 1749-1762.

Chakravarty, G. and M.C. Kalita. 2012. Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* against Bacterial Wilt of Brinjal and its Possible Plant Growth

Promoting Effects. Annals of Biological Research. 3(11): 5083-5094.

- Hanudin, W. Nuryani, E. Silvia, Djatnika dan B. Marwoto. 2010. Formulasi Biopestisida Berbahan Aktif *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Corynebacterium* sp. Nonpatogenik untuk Mengendalikan Penyakit Karat pada Krisan. J. Hort. 20(3): 247-261
- Holt, J.N., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Monteiro, L., R. Mariano, D.R. Lima and A.M. Souto-Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Brazilian Archives Biology and Tecnology. 48(1): 23-29.
- Pitt, J.I. and A.D. Hocking. 1997. Fungi and Food Spoilage. Cambridge: Great Britain at The University Press.
- Ramona, Y. 2003. Assessment of Some Antagonist and Development of Method Their Largescale Cultivation [Disertasi]. Tasmania: School of Agriculture Science, The University of Tasmania Australia.
- Rukmana. 1994. Budidaya Kubis Bunga dan Brokoli. Yogyakarta: Kanisius.
- Saksirirat, W., P. Chareerak and W. Bunyatrachata. 2009. Induced Systemic Resistance of Biocontrol Fungus, *Trichoderma* spp. Against Bacterial and Gray Leaf Spot in Tomatoes. Asian Journal of Food and Agro-Industry: 99-104.
- Smitha, C., G.T. Finosh, R. Rajesh and P.A. Abraham. 2014. Induction of Hydrolytic Enzymes of Phytopathogenic fungi in Response to *Trichoderma viride* Influence Biocontrol Activity. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(9): 1207-1217.
- Soesanto, L. 2008. Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.

- Suryanti, I.A.P., Y. Ramona dan M.W. Proborini. 2013. Isolasi dan Identifikasi Jamur Penyebab Penyakit Layu dan Antagonisnya pada Tanaman Kentang yang Dibudidayakan di Bedugul, Bali. *Jurnal Biologi*. 17(2): 37-41.
- Tapwal, A.A., J.U. Singh, T.D. Silva, G. Singh, S. Garg and R. Kumar. 2011. In Vitro Antagonism of *Trichoderma viride* against Five Phytopathogenic. *Pest Technology Research Paper*. 5(1): 59-62.
- Tribak, M., J.A. Ocampo and I. Garcia-Romera. 2002. Production of Xyloglucanolytic Enzyme by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyce inflatus* and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia Journal*. 3: 404-410.
- Yasmin, S., R.L. Matoo and F.A. Nehvi. 2013. Isolation, Characterization and Molecular Weight Determination of Cellulase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology*. 12(28): 4512-4518.