

Reaksi Hipersensitif Daun Tembakau oleh Isolat Bakteri Pelarut Kalium pada Praformulasi Pupuk Hayati

Diyan Herdiyantoro, Mieke Rochimi Setiawati, Tualar Simarmata

Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung – Sumedang KM 21 Jatinangor, Sumedang

Korespondensi: d.herdiyantoro@unpad.ac.id

ABSTRACT

The fruitfulness of biofertilizer application in increasing plant growth and yield is when the formulation uses selected microbial isolates that do not cause disease to plants. Hypersensitivity test is carried out to ensure that the microbial isolates used in the formulation of biofertilizer are not pathogenic to plants. The purpose of this study was to determine the pathogenicity of three selected potassium solubilizing bacteria (KSB) isolates (BPK-DHJ3-3150[17], BPK-DHJ1-4125[2], and BPK-DHJ2-5250[16]) isolated from the maize plant rhizosphere on Inceptisols Jatinangor. The research was conducted using a qualitative experimental method that obtained data in the form of visual photos. The three selected KSB isolates were inoculated on tobacco leaves and observed for necrosis symptoms. The experimental results showed that the three selected KSB isolates did not cause a positive hypersensitivity reaction in tobacco leaves, which was indicated by the absence of necrosis symptoms at the leaf location where the KSB isolates were inoculated. The three KSB isolates were non-pathogenic isolates to plants.

Keywords: *Potassium solubilizing bacteria, hypersensitivity test, tobacco, pathogenicity.*

1. PENDAHULUAN

Aplikasi pupuk hayati akan memberikan pengaruh positif terhadap tanaman yang diinokulasi jika memenuhi beberapa persyaratan dalam formulasinya antara lain menggunakan isolat terpilih hasil seleksi dan tidak bersifat patogen. Dua puluh lima isolat bakteri pelarut kalium (BPK) telah diisolasi dari rizosfer tanaman jagung pada Inceptisols di Jatinangor (Herdiyantoro *et al.*, 2018a). Hasil seleksi terhadap isolat-isolat BPK mendapatkan tiga isolat BPK terpilih yang mempunyai aktivitas tinggi dalam melarutkan mineral K-felspar sebagai sumber kalium dalam tanah (Herdiyantoro *et al.*, 2018b). Ketiga isolat BPK terpilih tersebut merupakan basis dalam formulasi pupuk hayati pelarut kalium sebagai fasilitator ketersediaan kalium bagi tanaman. Pengujian keamanan pupuk hayati, terutama pada praformulasi, harus dilakukan untuk memastikan isolat mikrob dalam formula pupuk hayati tidak berbahaya terhadap makhluk hidup lainnya.

Pengujian keamanan pupuk hayati dilakukan melalui uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau yang diinokulasi mikrob

yang digunakan dalam formulasi pupuk hayati (Fahy dan Lloyd, 1983; Husen, 2013; Kepmentan, 2019). Reaksi hipersensitif yang menandakan mikrob pada pupuk hayati bersifat patogen dicirikan oleh timbulnya gejala bercak nekrosis pada daun tembakau, yaitu perubahan warna jaringan daun yang diinokulasi mikrob uji dari hijau berubah menjadi cokelat yang diikuti dengan mengeringnya jaringan tersebut (Hanudin dan Rahardjo, 2011; Husen, 2013). Uji hipersensitivitas bertujuan untuk menjamin bahwa mikrob dalam formula pupuk hayati tidak bersifat patogen bagi tanaman.

Reaksi hipersensitif telah banyak digunakan untuk mendeteksi apakah isolat mikrob merupakan patogen atau nonpatogen bagi tanaman. Hasil penelitian Rahmayuni *et al.* (2018) menunjukkan dua isolat bakteri pelarut fosfat (BPF-CA dan BPF-RG) menimbulkan gejala nekrosis bercak kecokelatan pada daun tembakau sedangkan dua isolat lainnya (BPF-P dan BPF-J) tidak menimbulkan gejala nekrosis. Selain itu, hasil penelitian Sodiq *et al.* (2019) menunjukkan isolat-isolat mikrob yang diisolasi dari larutan mikroorganisme lokal (MOL) memberikan reaksi hipersensitif negatif

pada daun tembakau sedangkan mikroba patogen yang digunakan sebagai kontrol memberikan reaksi hipersensitif positif yang ditunjukkan dengan adanya nekrosis pada daun dengan pola menyebar.

Uji hipersensitivitas perlu dilakukan terhadap tiga isolat BPK terpilih asal rizosfer tanaman jagung pada praformulasi pupuk hayati pelarut kalium. Hasil penelitian yang diharapkan adalah ketiga isolat BPK terpilih tidak bersifat patogen bagi tanaman. Ketiga isolat BPK terpilih selanjutnya dapat diformulasikan menjadi pupuk hayati pelarut kalium yang dapat meningkatkan ketersediaan kalium dalam tanah, pertumbuhan, dan hasil tanaman tanpa menyebabkan penyakit pada tanaman ketika diaplikasikan di lapangan.

2. METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei–Juli 2021 di Laboratorium Biologi Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran. Bahan yang digunakan antara lain tiga isolat BPK terpilih, yaitu: BPK-DHJ3-3150(17) (*Burkholderia cenocepacia*), BPK-DHJ1-4125(2) (*Streptomyces pseudovenezuelae*), dan BPK-DHJ2-5250(16) (*Klebsiella* sp.) (Herdiyantoro, 2018b); media *nutrient broth* (NB); dan bibit tanaman tembakau (*Nicotiana glauca*) yang diperoleh dari petani tembakau di Desa Pasigaran, Kecamatan Tanjungsari, Kabupaten Sumedang. Alat yang digunakan antara lain peralatan gelas untuk analisis mikrobiologis, *shaker*, *laminar air flow*, spektrofotometer, alat suntik (*syringe*) dengan diameter jarum 0,4 mm, dan kamera digital.

Penelitian dilakukan menggunakan metode percobaan kualitatif yang menghasilkan keluaran data berupa foto visualisasi objek percobaan yang diberikan perlakuan (Yin, 2016). Percobaan dilakukan untuk mengetahui patogenisitas tiga isolat BPK terpilih yang diisolasi dari rizosfer tanaman jagung pada Inceptisols di Jatinangor. Patogenisitas isolat mikroba dapat diketahui melalui pengujian dengan metode uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau (Barantan, 2008; Hanudin dan Rahardjo, 2011). Bibit tanaman tembakau

yang digunakan adalah bibit berdaun 3–4 helai dan sehat. Respons yang diamati adalah reaksi hipersensitif daun tembakau yang diinokulasi tiga isolat BPK terpilih dalam bentuk foto visual.

Uji hipersensitivitas dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan inokulum isolat-isolat BPK terpilih pada media NB, yaitu:
 - Menyiapkan tiga isolat BPK yang telah diremajakan dalam agar miring Aleksandrov;
 - Masing-masing isolat BPK diinokulasikan ke dalam 100 ml media NB lalu dikocok di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu ruang (26 °C);
 - Menetapkan kepadatan populasi setiap inokulum isolat BPK berumur 24 jam dengan mengukur *optical density* dan menghitungnya menggunakan persamaan kurva standar isolat BPK. Inokulum isolat BPK-DHJ3-3150(17), BPK-DHJ1-4125(2), dan BPK-DHJ2-5250(16) mempunyai kepadatan populasi masing-masing $6,12 \times 10^{10}$ CFU ml⁻¹, $1,17 \times 10^{11}$ CFU ml⁻¹, dan $7,23 \times 10^{10}$ CFU ml⁻¹.
2. Inokulasi inokulum isolat BPK pada daun tembakau, yaitu:
 - Menginokulasikan masing-masing 1 ml inokulum isolat BPK menggunakan alat suntik ke dalam jaringan daun tembakau dengan cara menyuntikkan jarum suntik steril di antara kedua epidermis daun (*mesophyll*) pada bagian belakang helaian daun yang terletak di antara tulang daun;
 - Menekan alat suntik untuk memasukkan inokulum isolat BPK ke dalam *mesophyll*, tanpa merusak epidermis daun, hingga terlihat adanya bagian yang tampak kebasahan (*zoning*) pada daun yang terisi inokulum isolat BPK;
 - Masing-masing inokulum isolat BPK disuntikkan sebanyak tiga

ulangan pada daun tanaman tembakau (termasuk kontrol negatif, tanpa isolat BPK, hanya menggunakan media NB steril);

- Selanjutnya daun tembakau diberi label sesuai inokulum isolat BPK yang diinokulasikan dan diinkubasi selama 48 jam di dalam rumah kaca;
- Reaksi hipersensitif dinyatakan positif bila terbentuk nekrosis pada jaringan daun tembakau (pada daerah zoning), sedangkan yang tidak mengalami gejala nekrosis atau hanya berwarna kekuningan berarti reaksi hipersensitif dinyatakan negatif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat-isolat BPK terpilih yaitu BPK-DHJ3-3150(17), BPK-DHJ1-4125(2), dan BPK-DHJ2-5250(16) menunjukkan reaksi hipersensitif

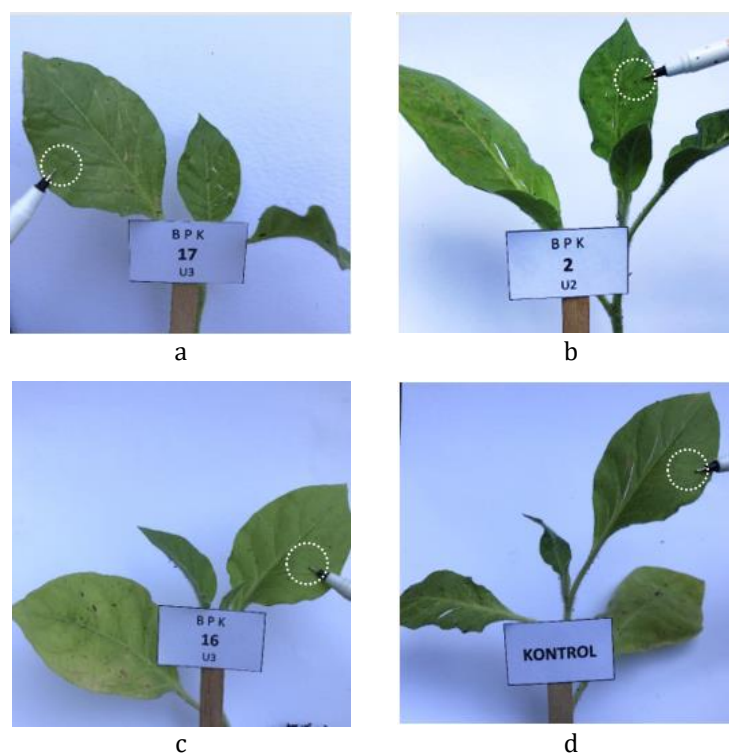
negatif terhadap daun tembakau. Reaksi yang sama ditunjukkan oleh kontrol (tanpa isolat BPK) yang memberikan reaksi hipersensitif negatif terhadap daun tembakau (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil Uji Hipersensitivitas Daun Tembakau karena Inokulasi Isolat-Isolat BPK Terpilih

Perlakuan	Reaksi Hipersensitif
Isolat BPK-DHJ3-3150(17)	Negatif
Isolat BPK-DHJ1-4125(2)	Negatif
Isolat BPK-DHJ2-5250(16)	Negatif
Kontrol (Tanpa Isolat BPK)	Negatif

Keterangan: Kontrol yaitu daun tembakau yang diinokulasi media NB steril yang tidak mengandung inokulum isolat BPK.

Gejala nekrosis tidak ditunjukkan oleh daun tembakau pada lokasi penyuntikan inokulum isolat BPK (Gambar 1).



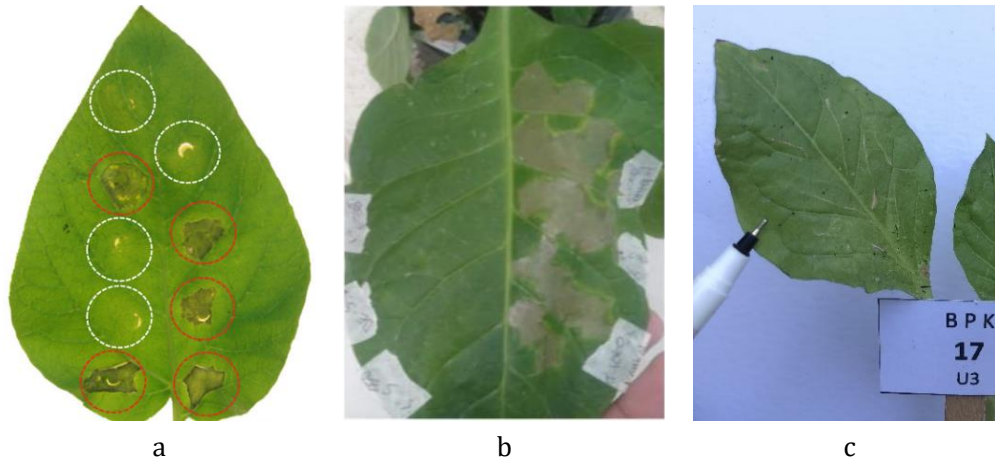
Gambar 1 Reaksi Hipersensitif Negatif Daun Tembakau karena Inokulasi Tiga Isolat BPK Terpilih pada 48 Jam Setelah Inokulasi dengan Ciri Tidak Menunjukkan Gejala Nekrosis. (a) Isolat BPK-DHJ3-3150(17), (b) Isolat BPK-DHJ1-4125(2), (c) Isolat BPK-DHJ2-5250(16), dan (d) Kontrol (Tanpa Isolat BPK) (Sumber: Herdiyantoro, 2021)

Deskripsi perbandingan respons antara reaksi hipersensitif negatif daun

tembakau akibat inokulasi isolat BPK terpilih dengan reaksi hipersensitif positif akibat

inokulasi mikrob patogen pada beberapa tanaman ditampilkan pada Gambar 2 berikut. Gambar 2(a) menunjukkan reaksi hipersensitif positif yang ditandai oleh adanya gejala nekrosis dengan pola menyebar pada daun kentang (*Solanum tuberosum* MaR8) yang diinokulasi patogen *Phytophthora infestans* (Vossen *et al.*, 2014). Gambar 2(b) menunjuk-

kan gejala nekrosis dengan pola menyebar pada daun tembakau yang diinokulasi mikrob patogen sebagai kontrol positif (Sodiq *et al.*, 2019). Sementara itu, Gambar 2(c) menunjukkan reaksi hipersensitif negatif daun tembakau akibat inokulasi isolat BPK-DHJ3-3150(17) yang tidak menunjukkan gejala nekrosis.



Gambar 2 Daerah Daun dengan Tanda Lingkaran Terputus-Putus Merah Menunjukkan Reaksi Hipersensitif Positif sedangkan Putih Menunjukkan Reaksi Hipersensitif Negatif. (a) Gejala Nekrosis pada Daun Kentang yang Diinokulasi *Phytophthora infestans* (Sumber: Vossen *et al.*, 2014); (b) Gejala Nekrosis pada Daun Tembakau yang Diinokulasi Mikrob Patogen (Sumber: Sodiq *et al.*, 2019); (c) Tidak Adanya Gejala Nekrosis pada Daun Tembakau yang Diinokulasi Isolat BPK-DHJ3-3150(17) (Sumber: Herdiyantoro, 2021)

Hasil percobaan menunjukkan bahwa ketiga isolat BPK terpilih merupakan isolat-isolat bakteri yang tidak bersifat patogen bagi tanaman. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Rahmayuni *et al.* (2018) yang menunjukkan dua isolat bakteri pelarut fosfat yaitu BPF-P (asal rizosfer padi) dan BPF-J (asal rizosfer jagung) tidak berpotensi sebagai patogen pada tanaman yang dibuktikan dengan reaksi hipersensitif negatif pada daun tembakau.

Hasil penelitian Sodiq *et al.* (2019) menunjukkan 25 isolat *Azotobacter* sp. dan 15 isolat *Azospirillum* sp. yang diisolasi dari larutan mikroorganisme lokal (MOL) tidak bersifat patogen bagi tanaman yang dibuktikan dengan reaksi hipersensitif negatif pada daun tembakau. Kerr dan Gibb (1997) menyatakan bahwa apabila bakteri yang diuji bersifat patogen maka akan terjadi nekrosis pada daun tembakau yang berarti terjadi hubungan yang kompatibel antara bakteri patogen dan

tembakau, sedangkan bakteri yang bersifat tidak patogen maka bakteri tidak dapat berkembang di dalam jaringan daun tembakau.

Tanaman tembakau dijadikan sebagai tanaman indikator untuk mengetahui keamanan bakteri terhadap tanaman karena dapat memberi respons sangat cepat terhadap bakteri patogen yang berada di dalam jaringan daun. Respons tersebut adalah reaksi hipersensitif berupa gejala nekrosis yaitu kematian sel-sel jaringan tanaman yang merupakan cara tanaman tembakau menghambat bakteri patogen agar tidak menyebar ke seluruh jaringan (Agrios, 2005). Reaksi hipersensitif ditandai dengan terjadinya pengeringan dan kematian sel inang di sekitar tempat invasi, selanjutnya patogen akan terisolasi dari jaringan yang hidup dengan adanya pembatas berupa sel-sel jaringan yang telah mati kemudian daerah tersebut akan terpotong (Fahy dan Lloyd, 1983; Kerr dan Gibb, 1997).

Uji hipersensitivitas sangat perlu dilakukan dalam formulasi pupuk hayati sebagai jaminan bahwa mikrob dalam pupuk hayati bukan merupakan patogen bagi tanaman (Husen, 2013). Kementerian Pertanian melalui Keputusan Menteri Pertanian No. 261/2019 mengatur persyaratan teknis minimal pupuk hayati yang beredar di Indonesia. Salah satunya adalah mikrob-mikrob dalam formula pupuk hayati harus dilakukan uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau oleh lembaga penguji mutu pupuk hayati yang ditunjuk oleh Kementerian Pertanian. Hasil uji hipersensitivitas mikrob-mikrob penyusun pupuk hayati harus menghasilkan respons negatif pada daun tembakau.

Uji hipersensitivitas sebaiknya dilakukan seawal mungkin terhadap isolat-isolat mikrob terpilih pada saat praformulasi pupuk hayati. Hal tersebut untuk menghindari sumber daya yang terbuang percuma jika isolat mikrob terpilih yang langsung dilakukan karakterisasi morfologi dan fisiologi, formulasi pupuk hayati, bahkan ~~hingga~~ sampai pada proses uji mutu dan uji efektivitas untuk memastikan secara akurat isolat-isolat mikrob dalam pupuk hayati bersifat nonpatogen bagi tanaman. Selain itu, aplikasi pupuk hayati dapat memberikan pengaruh positif terhadap tanaman yang diinokulasi jika dalam formulasinya menggunakan isolat mikrob terpilih yang tidak bersifat patogen bagi tanaman.

Isolat-isolat BPK-DHJ3-3150(17), BPK-DHJ1-4125(2), dan BPK-DHJ2-5250(16) hasil seleksi yang diisolasi dari rizosfer tanaman jagung pada Inceptisols di Jatinangor tidak bersifat patogen bagi tanaman berdasarkan hasil uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau. Ketiga isolat BPK terpilih tersebut berpotensi untuk dikembangkan dalam formulasi pupuk hayati pelarut kalium yang aman bagi tanaman. Penelitian terhadap ketiga isolat BPK terpilih dapat terus berlanjut untuk mengetahui karakteristik dan potensinya dalam memfasilitasi ketersediaan kalium bagi tanaman, yang pada akhirnya dapat meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman ketika diaplikasikan di lapangan.

4. KESIMPULAN

Isolat bakteri pelarut kalium BPK-DHJ3-3150(17), BPK-DHJ1-4125(2), dan BPK-DHJ2-5250(16) bukan bakteri patogen bagi tanaman yang ditunjukkan oleh reaksi hipersensitif negatif pada tanaman tembakau. Ketiga isolat BPK terpilih dapat dikembangkan lebih lanjut dalam formulasi pupuk hayati pelarut kalium.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Academic Press. New York.
- Badan Karantina Pertanian. 2008. Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Bakteri. Departemen Pertanian Republik Indonesia, Badan Karantina Pertanian. Jakarta.
- Fahy, P.C. and A.B. Lloyd. 1983. *Pseudomonas: The Fluorescent Pseudomonas*. In: Fahy, P.C. and G.J. Persley (eds.). *Plant Bacterial Disease, a Diagnostic Guide*. Academic Press. Australia.
- Hanudin dan I.B. Rahardjo. 2011. Karakteristik *Pseudomonas viridiflava*: Penyebab penyakit busuk lunak dan evaluasi virulensinya pada klon anggrek *Phalaenopsis*. J. HPT Tropika 11 (2): 185-193.
- Herdiyantoro, D., T. Simarmata, M.R. Setiawati, N. Nurlaeny, B. Joy, J.S. Hamdani, and I. Handayani. 2018a. *Exploration and identification of potassium solubilizing rhizo-bacteria isolate colony morphology from corn plant rhizosphere that potentially as a potassium solubilizing biofertilizer*. Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon. 4 (2): 178-183.
- Herdiyantoro, D., M.R. Setiawati, T. Simarmata, N. Nurlaeny, B. Joy, J.S. Hamdani, and I. Handayani. 2018b. *The ability of potassium solubilizing rhizo-bacteria isolated from maize rhizosphere for microbial fertilizer*. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 205:012011.
- Husen, E. 2013. Kajian Sistem Kendali Mutu Pupuk Hayati Pra-Komersialisasi. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian. Bogor.

- Keputusan Menteri Pertanian Nomor 261 Tahun 2019. *Persyaratan Teknis Minimal Pupuk Organik, Pupuk Hayati, dan Pembenah Tanah*. 1 April 2019. Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Jakarta.
- Kerr, A. and K. Gibb. 1997. *Bacteria and Phytoplasma as Plant Parasites*. In: Brown, J.F. and H.J. Ogle (eds.). *Plant Pathogens and Plant Disease*. Australian Plant Pathology Society. Armidale.
- Rahmayuni, E., S. Ismiani, D.H. Muslimah, E.D.I. Wilujeng, dan M.N. Rizqulloh. 2018. Karakterisasi dan viabilitas isolat bakteri pelarut fosfat dalam bahan pembawa kompos dan zeolit. *Jurnal Agrosains dan Teknologi* 3 (1): 31-38.
- Sodiq, A.H., M.R. Setiawati, D.A. Santosa, dan D. Widayat. 2019. Potensi mikroba asal mikroorganisme lokal dalam meningkatkan perkecambahan benih paprika. *Jur. Agroekotek* 11 (2): 214-226.
- Vossen, J.H., K.R. Jo, and B. Vosman. 2014. *Mining the Genus Solanum for Increasing Disease Resistance*. In: Tuberosa, R. et al. (eds.). *Genomics of Plant Genetic Resources*. Springer Science+Business Media. Dordrecht.
- Yin, R.K. 2016. *Qualitative Research from Start to Finish*. Second Edition. The Guilford Press. New York.