

**POTENSI ISOLAT *PSEUDOMONAS* BERFLUORESEN DALAM
MENGHASILKAN ASAM SIANIDA (HCN) UNTUK APLIKASI AGENS
HAYATI**

Fadila Aulia, Linda Advinda*, Moralita Chatri, Siska Alicia Farma

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang,
Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Barat, Padang 25131, Indonesia
e-mail:linda_advinda@fmipa.unp.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menilai kemampuan beberapa isolat *Pseudomonas* berfluoresen dalam menghasilkan asam sianida (HCN) sebagai indikator potensi agens hayati. Lima isolat diuji, yaitu Pf Cas 3, Pf Cas, Pf LAH T2, Pf LAH, dan Pf LAH S1, serta satu kontrol tanpa inokulum. Pengujian dilakukan menggunakan indikator asam pikrat-Na₂CO₃ dan pengukuran nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Hasil menunjukkan bahwa isolat Pf Cas 3, Pf Cas, dan Pf LAH T2 menghasilkan HCN dengan nilai absorbansi masing-masing 0,021; 0,014; dan 0,012. Sementara Pf S32 dan Pf LAH S1 menunjukkan hasil negatif dengan nilai absorbansi rendah (0,003 dan 0,002). Kontrol menunjukkan nilai 0,00. Berdasarkan hasil penelitian, isolat Pf Cas 3 memiliki kemampuan produksi HCN tertinggi dengan nilai absorbansi 0,021. Dengan demikian, Pf Cas 3 dapat disimpulkan sebagai isolat paling potensial untuk dikembangkan sebagai agens hayati penghasil HCN.

Kata kunci: ***Pseudomonas* berfluoresen, HCN, agens hayati, spektrofotometer.**

Abstract

This study aimed to assess the ability of several fluorescent *Pseudomonas* isolates to produce hydrocyanic acid (HCN) as an indicator of potential biological agents. Five isolates were tested, namely Pf Cas 3, Pf Cas, Pf LAH T2, Pf LAH, and Pf LAH S1, as well as one control without inoculum. The test was carried out using picric acid-Na₂CO₃ as an indicator and absorbance measurements with a spectrophotometer at a wavelength of 625 nm. The results showed that isolates Pf Cas 3, Pf Cas, and Pf LAH T2 produced HCN with absorbance values of 0.021, 0.014 and 0.012, respectively. Meanwhile, Pf S32 and Pf LAH S1 showed negative results with low absorbance values (0.003 and 0.002). The control showed a value of 0.00. Based on the results of the study, isolate Pf Cas 3 had the highest HCN production capacity with an absorbance value of 0.021. Thus, Pf Cas 3 can be concluded as the most potential isolate to be developed as a biological agent producing HCN.

Keywords: ***Fluorescent Pseudomonas, HCN, biological agent, spectrophotometer.***

1. PENDAHULUAN

Pertumbuhan tanaman yang optimal sangat bergantung pada keseimbangan mikroorganisme di lingkungan perakaran. Namun, produksi tanaman sering terganggu oleh penyakit tular tanah seperti

Fusarium oxysporum dan *Ralstonia solanacearum*, yang menyebabkan kerugian besar pada berbagai komoditas pertanian. Pengendalian menggunakan pestisida kimia masih menjadi pilihan utama, tetapi penggunaannya yang berlebihan berdampak negatif terhadap kesehatan tanah dan lingkungan (Hofte, 2021; Santoyo *et al.*, 2021). Sebagai alternatif ramah lingkungan, pemanfaatan mikroorganisme antagonistik atau agens hayati menjadi pendekatan yang berpotensi besar. Salah satu kelompok bakteri yang telah banyak diteliti adalah *Pseudomonas* berfluoresen, bakteri gram negatif yang hidup di rizosfer tanaman dan menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti siderofor, antibiotik, dan asam sianida (HCN)). (Anand *et al.*, 2020; Weller *et al.*, 2017)

HCN merupakan senyawa volatil yang dihasilkan melalui metabolisme asam amino glisin dengan bantuan enzim HCN sintase. Senyawa ini dapat menghambat enzim sitokrom oksidase yang penting dalam respirasi sel patogen, sehingga mengganggu pertumbuhan dan perkembangannya (Létoffé *et al.*, 2022; Tripathi *et al.*, 2023). Dengan demikian, kemampuan isolat *Pseudomonas* dalam menghasilkan HCN menjadi indikator penting untuk menilai potensi antagonistiknya terhadap patogen tanaman. Selain itu, variasi kemampuan produksi HCN antar-isolat dipengaruhi oleh faktor genetik, kondisi media, pH, serta ketersediaan oksigen dan sumber karbon (De Vleeschauwer & Höfte, 2020; Ghosh *et al.*, 2021). Oleh karena itu, penting dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif terhadap isolat *Pseudomonas* berfluoresen untuk menentukan isolat yang paling potensial menghasilkan HCN.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan membandingkan kemampuan lima isolat *Pseudomonas* berfluoresen dalam menghasilkan asam sianida (HCN) menggunakan metode asam pikrat–Na₂CO₃ serta pengukuran spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2025 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Sterilisasi Alat

Sebelum disterilisasi, alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian dicuci bersih dan dikeringkan. Cawan petri dibungkus dengan kertas. Sterilisasi alat tahan panas seperti cawan petri, gelas piala, gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer, medium, dan akuades dilakukan dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas

disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%, sedangkan alat yang terbuat dari logam seperti pinset disterilkan dengan menggunakan api pijar sampai berwarna merah.

2.2.2 *Pembuatan Medium King's B*

Bubuk King's B ditimbang sebanyak 21,1 g, kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan akuades sebanyak 250 mL, setelah itu diaduk hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan gliserol sebanyak 7,5 mL dan dihomogenkan. Dilakukan penambahan akuades hingga larutan mencapai 500 mL. Larutan dipanaskan menggunakan magnetic stirrer sampai mendidih, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil dan di wrapping. Selanjutnya medium disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit

2.2.3 *Pembuatan Medium Nutrient Broth (NB)*

Proses pembuatan medium diawali dengan menimbang bubuk NB sebanyak 8 g. Kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala, lalu ditambahkan akuades hingga volumenya 1000 mL. Larutan tersebut dipanaskan diatas magnetic stirrer hingga mendidih, setelah itu dimasukkan ke dalam 20 erlenmeyer ukuran 250 mL, masingmasing erlenmeyer berisi 50 mL medium NB, lalu di tutup rapat menggunakan aluminium foil serta diberi plastik wrap. Selanjutnya medium disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

2.2.4 *Pembuatan Medium produksi Asam Sianida (TSA+Glisin)*

Medium produksi Asam sianida dibuat dengan bubuk TSA ditimbang sebanyak 20 g dan glisin 2,1 g, kemudian dimasukan ke dalam gelas piala dan ditambahkan akuades hingga mencapai volume 500 mL. Setelah itu medium dipanaskan di atas magnetic stirrer dan dihomogenkan sampai mendidih. Setelah mendidih, medium dimasukkan ke dalam 2 erlenmeyer ukuran 250 mL. Mulut erlenmeyer ditutup rapat dengan kapas dan alumunium foil serta diberi label. Kemudian sterilisasi di dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

2.2.5 *Pembuatan larutan indikator produksi Asam Sianida (asam pikrat + natrium karbonat)*

Pembuatan indikator produksi Asam sianida dilakukan dengan cara ditimbang 1 g bubuk asam pikrat dan 4 g bubuk natrium karbonat, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 100 mL. Setelah itu dihomogenkan menggunakan batang pengaduk.

2.2.6 *Persiapan kertas saring uji kemampuan menghasilkan Asam Sianida*

Persiapan kertas saring dilakukan dengan kertas saring dipotong membentuk persegi panjang

dengan ukuran 2×4 cm, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit, setelah itu disimpan di dalam oven.

2.2.7 Peremajaan dan perbanyakan isolat *Pseudomonas berfluoresen*

Isolat *pseudomonas* berfluoresen yang digunakan adalah isolat, yaitu Pf Cas, Pf Cas 3, Pf LAH S1, Pf LAH T2 dan Pf S32. Masing-masing isolat diambil menggunakan jarum ose dari eppendorf yang telah divortex dan diremajakan dalam cawan petri pada medium King's B dengan metode gores, kemudian diinkubasi 2×24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya perbanyakkan inokulum dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan murni dalam petri, kemudian dibiakkan dalam 50 mL medium NB di dalam erlenmeyer 250 mL dan di shaker selama 2×24 jam dengan kecepatan 100 rpm.

2.2.8 Pelaksanaan Penelitian

1) Uji Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan mengambil 1 mL suspensi *Pseudomonas* berfluoresen (populasi 3×10^8 sel/mL, skala 1 Mc. Farland's), kemudian memasukkannya ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya menuangkan medium glisin+TSA ke dalam cawan petri, dan menghomogenkannya dengan cara memutar cawan petri seperti angka delapan. Medium ditunggu hingga padat. Setelah medium padat, cawan petri diletakkan terbalik. Pada bagian tutup cawan petri ditempelkan potongan kertas saring yang telah ditetes 0,1 mL larutan indikator yang telah dipersiapkan. Selanjutnya menginkubasi biakan kultur bakteri pada suhu ruang selama 2×24 jam. Warna kertas saring yang tetap kuning menunjukkan isolat yang diuji tidak memproduksi asam sianida, sedangkan warna coklat muda, tua dan merah bata menandakan produksi asam sianida yang semakin tinggi (Murugappan *et al.*, 2006).

2) Uji Kuantitatif

Kertas saring yang memperlihatkan perubahan warna (juga yang tidak berubah warna) dicuci dengan cara memasukkan kertas saring dengan pinset ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL akuades. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm (Meena *et al.*, 2001).

3) Pengamatan Penelitian

Pengamatan meliputi adanya perubahan warna dan tingkatan perubahan warna pada kertas saring. Analisis kualitatif dilakukan dengan mengamati perubahan warna kertas saring yang

memperlihatkan warna kuning menunjukkan tidak adanya asam sianida (HCN), warna coklat muda menunjukkan reaksi HCN lemah, warna coklat menunjukkan reaksi moderat, sedangkan merah bata menunjukkan reaksi kuat (Advinda *et al.*, 2018). Selain itu, kemampuan HCN juga dilakukan dengan analisis kuantitatif dengan membandingkan nilai absorbansi antar isolat dengan menggunakan alat spektrofotometer (Meena *et al.*, 2001).

2.2.9 Analisis Data

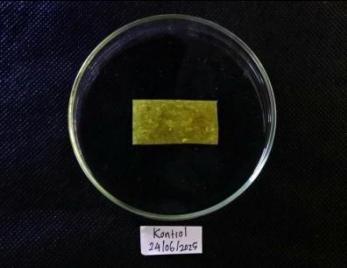
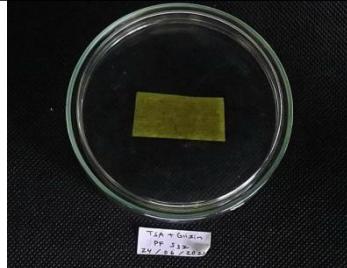
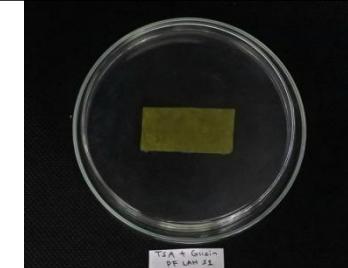
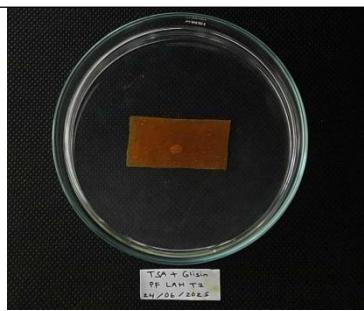
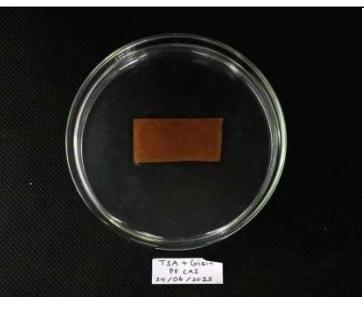
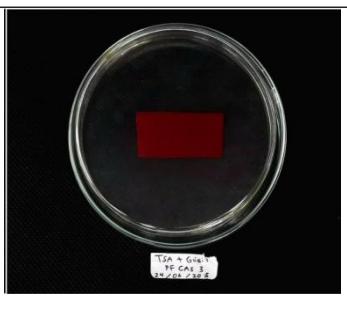
Data kemampuan isolat *Pseudomonas* berfluoresen dalam memproduksi asam sianida dianalisis secara deskriptif melalui analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif disajikan dalam tabel dan gambar, sedangkan analisis kuantitatif disajikan dalam grafik.

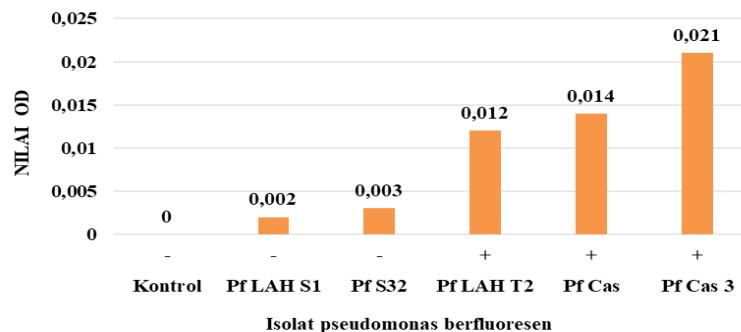
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan beberapa isolat *Pseudomonas* berfluoresen dalam menghasilkan HCN memperlihatkan tingkat produksi yang berbeda, ditandai dengan warna kertas saring dan nilai absorbansi yang berbeda. Pada Tabel 1. terlihat kemampuan setiap isolat pf dalam menghasilkan HCN, dengan kriteria mulai dari lemah, moderat, dan kuat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa intensitas perubahan warna pada kertas pikrat berbeda antar-isolat. Isolat Pf Cas 3 memperlihatkan perubahan warna paling kuat dibandingkan isolat lainnya, yang mengindikasikan tingkat produksi HCN yang lebih tinggi. Temuan ini sejalan dengan temuan Murugappan *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa warna kuning menandakan tidak adanya HCN, sedangkan perubahan warna coklat hingga merah bata menunjukkan produksi HCN yang semakin tinggi.

Tabel 1. Kemampuan isolat *Pseudomonas* berfluoresen dalam menghasilkan HCN

Kontrol	Pf S32	Pf LAH S1
-	+	+
		
Pf LAH T2	Pf Cas	Pf Cas 3
++	++	+++
		



Gambar 1. Nilai Absorbansi HCN isolat *Pseudomonas* berfluoresen

Keterangan:

+++ = kuat

++ = moderat

+ = lemah

- = tidak menghasilkan HCN

Hasil pengujian menggunakan spektrofotometer memperlihatkan nilai absorbansi (OD) setiap isolat *Pseudomonas* berfluoresen juga berbeda. Pada Gambar 1. terlihat tiga isolat (yaitu: Pf Cas 3, Pf Cas, dan Pf LAH T2) menunjukkan nilai absorbansi lebih tinggi dibandingkan dua isolat lainnya (yaitu: Pf S32 dan Pf LAH S1). Isolat Pf Cas 3 memberikan nilai OD tertinggi yaitu 0,021.

Nilai absorbansi pada panjang gelombang 625 nm juga menjadi indikator kuantitatif produksi HCN. Pathak *et al.* (2025) menyatakan bahwa absorbansi yang lebih tinggi menunjukkan konsentrasi HCN yang lebih besar. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini, di mana Pf Cas 3 memiliki absorbansi tertinggi (0,021), sesuai dengan aktivitas HCN yang kuat, sementara Pf S32 dan Pf LAH S1 menunjukkan nilai rendah yang menandakan produksi HCN minimal.

Perubahan warna indikator yang paling kuat tampak pada isolat Pf Cas 3, sesuai dengan nilai absorbansi tertinggi yang diperoleh. Sementara itu, Pf S32 dan Pf LAH S1 tidak menimbulkan perubahan warna signifikan, menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut memiliki aktivitas produksi HCN yang lemah. Kontrol dengan nilai 0,00 menandakan tidak adanya interferensi dari reagen atau media, sehingga hasil pengukuran murni berasal dari aktivitas biologis isolat.

Temuan ini konsisten dengan penelitian Anand *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa isolat *Pseudomonas fluorescens* dengan produksi HCN tinggi menunjukkan kemampuan lebih baik dalam menekan patogen tular tanah. Aktivitas HCN berperan penting dalam menghambat pertumbuhan miselium patogen melalui penghambatan respirasi seluler. Selain faktor genetik, tingkat produksi HCN juga dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti pH, sumber karbon, dan ketersediaan nitrogen (Hofte, 2021). Faktor-faktor tersebut mungkin menjelaskan variasi nilai absorbansi antar-isolat dalam penelitian ini. Pf Cas 3 kemungkinan memiliki ekspresi gen hcnABC yang lebih tinggi dibandingkan isolat lain, sehingga menghasilkan HCN dalam jumlah lebih besar. Selain itu, kemampuan tumbuh cepat pada media King's B juga dapat meningkatkan aktivitas metabolismik yang mendukung sintesis HCN.

Berdasarkan hasil penelitian, isolat *Pseudomonas* berfluoresen menunjukkan kemampuan produksi HCN yang berbeda antar-isolat. Isolat Pf Cas 3 secara konsisten menghasilkan HCN dengan intensitas warna paling kuat dan nilai absorbansi tertinggi dibandingkan isolat lainnya. Temuan ini menunjukkan bahwa produksi HCN berperan sebagai salah satu mekanisme antagonisme terhadap patogen tular tanah. Dengan karakteristik tersebut, Pf Cas 3 berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat agens hayati berbasis bakteri untuk aplikasi pertanian.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Penelitian ini menilai potensi beberapa isolat Pseudomonas berfluoresen dalam menghasilkan asam sianida (HCN). Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat Pf Cas 3 memiliki kemampuan tertinggi dalam memproduksi HCN dengan nilai absorbansi 0,021, diikuti oleh Pf Cas (0,014) dan Pf LAH T2 (0,012), sedangkan Pf S32 dan Pf LAH S1 menunjukkan hasil negatif. Kemampuan produksi HCN ini berperan penting dalam mekanisme antagonisme terhadap patogen tular tanah melalui penghambatan respirasi seluler. Dengan demikian, isolat Pf Cas 3 berpotensi dikembangkan sebagai agens hayati penghasil HCN untuk mendukung sistem pertanian berkelanjutan yang ramah lingkungan.

4.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan uji isolat pada kondisi tanaman atau tanah asli agar efektivitas produksi HCN dapat dievaluasi secara nyata. Analisis statistik dan ulangan tambahan juga diperlukan untuk memperkuat validitas hasil. Identifikasi gen atau jalur metabolismik yang mendukung produksi HCN pada isolat unggul dapat membantu pengembangan agens hayati lebih efektif. Selain itu, pengembangan biopestisida multifungsi dengan kombinasi metabolit lain dapat meningkatkan kemampuan pengendalian patogen secara berkelanjutan, sambil tetap memperhatikan aspek keamanan lingkungan.

5. REFERENSI

- Advinda, L., et al. (2018). Potensi Pseudomonas fluorescens sebagai agens biokontrol penyakit tanaman. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 12(2), 45–52.
- Anand, T., & et al. (2020). Hydrogen cyanide production by rhizobacteria and its role in plant disease suppression. *Microbiological Research*, 234, 12643. <https://doi.org/DOI: 10.1016/j.micres.2019.126430>.
- De Vleesschauwer, D., & Höfte, M. (2020). Rhizobacteria-induced systemic resistance in plants: Mechanisms and prospects. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 93).
- Ghosh, R., Singh, P., Chauhan, N., & Sharma, S. (2021). Hydrogen cyanide production by and its impact on soil microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 13(2), 250–262. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12915>.
- Höfte, M. (2021). The role of fluorescent Pseudomonads in plant protection. *Annual Review of Phytopathology*, 59, 315–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-092027>.
- Létoffé, S., et al. (2022). Genetic regulation of hydrogen cyanide biosynthesis in Pseudomonas spp. *Frontiers in Microbiology*, 13, 978443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.978443>.

- Meena, B., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P., Velazhahan, R., . (2001). Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Dis. Protect.*, 108, 369–381.
- Murugappan, R. M., Muthukumar, C., Mohan, V., & Nakkeeran, S. (2006). *Hydrogen cyanide production by fluorescent pseudomonads and their role in biological control of plant pathogens.*
- Pathak, A., et al. (2025). Spectrophotometric estimation of hydrogen cyanide in rhizobacteria. *Applied Microbiology Reports*, 4(1), 15–22.
- Santoyo, G., et al. (2021). Plant growth-promoting bacteria as biofertilizers: Toward sustainable agriculture. *Microbiological Research*, 252, 126861. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>.
- Tripathi, R., et al. (2023). Optimization of HCN production by fluorescent *Pseudomonads* and its biocontrol efficacy against soil pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3), 955–966. <https://doi.org/10.1111/jam.15735>.
- Weller, D. M., et al. (2017). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 107(1), 6–24. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0063-RVW>.