

Seleksi dan Identifikasi Bakteri Antagonis sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit Hawar Pelepah Padi

Rustam¹, Giyanto², Suryo Wiyono², Dwi Andreas Santosa³, Slamet Susanto⁴

¹Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Riau
Jl. Kaharuddin Nasution No. 341 Pekanbaru

²Departemen Proteksi Tanaman, IPB

³Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, IPB

⁴Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fak. Pertanian, IPB
Jl Kamper Kampus IPB Dramaga Bogor

ABSTRACT. Selection and Identification of Antagonistic Bacteria as Biological Control Agents to Rice Sheath Blight Disease. Selection and identification of effective microbes are important steps to obtain biological control agents. The objective of this research was to screen potential bacteria as controlling agents for rice sheath blight disease. The research was conducted at plant bacteriological laboratory and green house of Plant Protection Division of Bogor Agricultural University, Bogor, from May 2010 to February 2011. The trial was arranged in a completely randomized design with bacterial isolates as treatment. The result showed that 30 out of 144 bacterial isolates indicated an antifungal activity to *R. solani*. *In vivo* test indicated that 3 of the 30 isolates which have antifungal activity were able significantly to suppress the rice sheath blight disease. Those isolates were marked as TT47, SS19 and BR2, with the ability to suppress rice sheath blight disease at rate of 79.6, 56.4, and 49.4%, disease index 1.7, 3.7, and 4.3, and the disease incidence 33.3%, 73.35, and 80%, respectively. Molecular characterization of partial sequence of 16S rRNA on SS19, TT47, and BR2 isolates showed that those bacteria are *Serratia marcescens*, *Ralstonia pickettii*, and *Bacillus subtilis*, respectively.

Key words: antagonistic bacteria, biological control agents, *Rhizoctonia solani*, rice sheath blight.

ABSTRAK. Seleksi dan identifikasi merupakan langkah penting dalam mendapatkan agens hayati untuk pengendalian penyakit tanaman. Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri antagonis yang potensial mengendalikan penyakit hawar pelepah padi. Penelitian dilaksanakan di laboratorium bakteriologi tanaman dan rumah kaca, Departemen Proteksi Tanaman IPB, Bogor, sejak bulan Mei 2010 sampai Pebruari 2011. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan isolat bakteri hasil isolasi dari beberapa lokasi ekosistem. Sebanyak 30 isolat dari 144 isolat bakteri yang diperoleh bersifat antagonis terhadap penyebab penyakit hawar pelepah padi (*R. solani*) di tingkat *in vitro*. Hasil pengujian di tingkat *in vivo*, ternyata tiga isolat dari 30 isolat bakteri antagonis tersebut menunjukkan penekanan signifikan terhadap perkembangan penyakit hawar pelepah, yaitu isolat TT47, SS19, dan BR2. Penekanan penyakit pada perlakuan isolat bakteri TT47, SS19, dan BR2 berturut-turut sebesar 79,6%, 56,4%, and 49,4%, indeks penyakit sebesar 1,7, 3,7, dan 4,3 serta kejadian penyakit 33,3%, 73,3%, dan 80%. Berdasarkan hasil identifikasi sekuens 16S rRNA ternyata isolat SS19, TT47, dan BR2 secara berturut-turut diidentifikasi sebagai *Serratia marcescens*, *Ralstonia pickettii*, dan *Bacillus subtilis*.

Kata kunci: bakteri antagonis, agens pengendali hayati, *Rhizoctonia solani*, hawar pelepah padi.

Hawar pelepah daun yang disebabkan oleh cendawan *Rhizoctonia solani* Kühn merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman padi. Patogen tersebut dapat bertahan hidup dalam tanah, sisa-sisa tanaman, dan memiliki kisaran inang yang luas (Ou 1985; Ogoshi 1987), sehingga sulit dikendalikan. Infeksi penyakit hawar pelepah dapat mengurangi hasil bahkan menyebabkan epidemi penyakit mengingat semakin gencarnya pengembangan varietas umur genjah berproduksi tinggi, peningkatan intensitas tanam, dan penggunaan pupuk nitrogen dengan takaran tinggi.

Sampai saat ini belum ada cara yang efektif untuk mengendalikan penyakit hawar pelepah padi. Penggunaan varietas tahan atau fungisida sebagai cara pengendalian yang banyak digunakan ternyata memiliki banyak kelemahan. Penggunaan varietas tahan akan memicu patogen membentuk strain baru, sehingga akan mematahkan ketahanan tersebut. Penggunaan fungisida yang cenderung diaplikasikan secara terus-menerus, selain efikasinya semakin berkurang juga berdampak negatif terhadap lingkungan (Pingali *et al.* 1995). Teknik yang efektif, kompatibel, dan berkelanjutan perlu dicari untuk mengendalikan penyakit hawar pelepah daun padi.

Salah satu cara pengendalian penyakit hawar pelepah yang lebih bijaksana saat ini adalah penggunaan bakteri antagonis sebagai agens hayati. Aplikasi agens hayati dapat melindungi tanaman dari penyakit dan meningkatkan pertumbuhan melalui beberapa mekanisme (Keel and Defago 1997). Nagarajkumar *et al.* (2005) melaporkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* pfMDU2 yang diaplikasikan pada tanaman padi dapat mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh *R. solani*. Grosch *et al.* (2005) menggunakan bakteri antagonis *P. fluorescens* B1, *P. fluorescens* B2, dan *Serratia plymuthica* B4 untuk mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh *R. solani* dan dapat mengurangi keparahan penyakit pada tanaman selada hingga 52% dan pada tanaman kentang hingga 37%. Someya *et al.* (2003) juga melaporkan

bahwa penggunaan bakteri antagonis *Serratia marcescens* strain B2 dapat menekan gejala penyakit hawar pelepah padi.

Isolat bakteri antagonis yang akan dikembangkan sebagai kandidat agens pengendali hayati penyakit hawar pelepah padi perlu mendapatkan serangkaian pengujian, mulai dari pengujian *in vitro*, *in planta*, dan *in vivo*. Beberapa bakteri agens hayati yang berpotensi mengendalikan penyakit hawar pelepah padi di tingkat *in vitro* telah diperoleh Sudir dan Suparyono (2000), tetapi belum diketahui jenis bakteri dan kemampuannya di tingkat *in vivo*. Padahal, potensi pengendalian patogen di tingkat *in vitro* tidak selalu merefleksikan kemampuannya di tingkat *in vivo* (Fravel 1988). Penelitian Rustam *et al.* (2005) menunjukkan bahwa isolat bakteri antagonis BRA61 dan ES32 yang cukup efektif menekan penyebab penyakit tanaman pisang di tingkat *in vitro* tidak mampu menekan gejala penyakit serupa di tingkat *in vivo*.

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri antagonis yang potensi menekan pertumbuhan dan perkembangan penyakit hawar pelepah padi yang disebabkan oleh *R. solani* di tingkat *in vitro* dan *in vivo*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Tanaman dan di Rumah Kaca Departemen Proteksi Tanaman, IPB, Bogor, sejak bulan Mei 2010 sampai Februari 2011.

Penyediaan Patogen (*R. solani*)

Cendawan *R. solani* diisolasi dari tanaman padi yang menunjukkan gejala penyakit hawar pelepah di Cikarawang, Bogor. Isolasi menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA), dengan komposisi ekstrak kentang 200 g/l, 20 g/l dekstrosa, dan 15 g/l agar. Sebelum digunakan dalam pengujian, isolat *R. solani* yang diperoleh diidentifikasi secara visual dan mikroskopis serta diuji patogenitasnya pada tanaman padi.

Uji patogenitas *R. solani* dilakukan dengan cara menginokulasikan potongan koloni (diameter 0,5 cm) biakan cendawan umur 3 hari pada media PDA ke bagian pangkal batang tanaman padi umur tiga minggu yang telah dipersiapkan sebelumnya dalam pot di rumah kaca. Untuk membentuk kondisi lembab, tanaman yang telah diinokulasi disungkup dengan kantong plastik. Setelah diinkubasi selama 7 hari, gejala berupa bercak-bercak besar dengan bagian tengah berwarna putih pucat terlihat di sepanjang pelepah daun yang diinokulasi. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat

cendawan yang diuji bersifat patogenik terhadap tanaman padi.

Penyediaan Isolat Bakteri Antagonis

Bakteri antagonis terhadap *R. solani* diisolasi dari contoh tanah yang berasal dari berbagai tanah sawah, air kolam, tanah tegalan, tanah aliran sungai, dan bagian tanaman padi dari beberapa ekosistem. Isolasi menggunakan metode pengenceran berseri. Sebanyak 10 g contoh tanah, bagian tanaman padi, atau air, masing-masing diencerkan dengan 90 ml air steril yang mengandung 0,85% NaCl dalam tabung Erlenmeyer 250 ml. Campuran dalam setiap tabung Erlenmeyer dikocok hingga merata, kemudian dibuat enceran 10 kali secara berseri sampai 10^{-3} . Selanjutnya, 0,1 ml dari masing-masing enceran 10^{-3} disebar ke dalam cawan petri yang berisi media King's B Agar (KBA) (20 g/l protease pepton, 1,5 g/l K_2HPO_4 , 1,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 ml/l gliserol, 15 g/l agar), nutrisi agar (NA), Water-Yeast Extract Agar (WYE) (0,25 g/l yeast extract, 18 g/l agar, 0,5 g/l K_2HPO_4) (Crawford *et al.* 1993), dan media Yeast dan Malt Extract (YM) selektif (4 g/l glukosa, 10 g/l malt extract, 4 g/l yeast extract, 20 mg/l trimethoprim, 50 mg/l griseofulvin, 50 mg/l nystatin) (Fotso *et al.* 2008).

Untuk mendapatkan isolat bakteri yang membentuk spora, suspensi enceran 10^{-3} dipanaskan dalam penangas air pada suhu 80°C selama 30 menit (Kim *et al.* 1997). Setelah dingin, 0,1 ml suspensi disebar ke dalam cawan petri yang berisi media Tryptic Soy Agar (TSA) (17 g pancreatic digest of casein, 15 g/l agar, 5 g/l NaCl, 3 g/l papaic digest of soybean meal, 2,5 g/l K_2HPO_4 , 2,5 g/l glukosa) (Kim *et al.* 1997).

Bahan diinkubasi pada suhu ruang hingga berbagai bentuk koloni bakteri tumbuh. Koloni bakteri yang tumbuh pada media KBA diamati di bawah lampu ultraviolet untuk membedakan kelompok bakteri *Pseudomonas* berfloresensi (memancarkan warna hijau kekuningan) dengan bakteri lainnya. Koloni *Pseudomonas* berfloresensi dan koloni bakteri lain yang menunjukkan karakter morfologi berbeda dipindahkan pada cawan media KBA baru hingga diperoleh biakan murni.

Sementara itu, koloni bakteri yang tumbuh pada media YM dipindahkan ke media YM baru hingga murni. Kemudian tiap koloni yang diperoleh diperiksa di bawah mikroskop binokuler untuk membedakan kelompok aktinomiset dengan bakteri lainnya (Crawford *et al.* 1993). Koloni bakteri dengan karakter berbeda yang tumbuh pada media TSA dipindahkan pada media TSA baru hingga diperoleh biakan murni. Biakan murni tiap isolat dipindahkan 1-2 ose ke dalam tabung ependorf 2 ml berisi air steril dan tabung ependorf 2 ml berisi gliserol

20%, masing-masing disimpan pada suhu ruang dan suhu -20°C untuk digunakan pada tahap pengujian selanjutnya.

Seleksi Isolat Bakteri Antagonis Secara *In Vitro*

Seluruh isolat hasil isolasi diseleksi berdasarkan uji potensi antagonismenya terhadap isolat *R. solani*. Pengujian dilakukan menggunakan supernatan biakan tiap isolat bakteri (Liu *et al.* 2007). Supernatan dibuat dengan cara: isolat yang diduga kelompok *Pseudomonas* berfloresensi, *Bacillus*, atau aktinomiset dibiakkan masing-masing dalam tabung Erlenmeyer 100 ml yang berisi 10 ml media Luria Broth (LB) (10 g casein, 5 g yeast ekstrak, 5 g NaCl, dan 1 l akuades), media Tryptic Soy Broth (TSB), atau media M2 (4 g glukosa, 4 g yeast ekstrak, dan 10 g malt ekstrak, dan 1000 ml akuades) (Fotso *et al.* 2008). Inkubasi dilakukan di atas inkubator bergoyang (150 rpm) pada suhu ruang selama 4 hari. Kemudian biakan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C , selama 10 menit. Supernatannya diambil dan diuji potensi antagonisme terhadap cendawan *R. solani* pada media padat dan cair.

Pengujian potensi antagonisme (antifungal) dari supernatan tiap isolat pada media padat dilakukan dengan memindahkan $10\ \mu\text{l}$ supernatan tiap isolat secara spot-spot pada permukaan media PDA dalam cawan petri. Sebelumnya potongan koloni cendawan *R. solani* berukuran diameter 0,5 cm ditempatkan di permukaan media PDA pada bagian tengah. Tiap pengujian diulang tiga kali. Bahan diinkubasikan dalam suhu ruang selama 3-4 hari. Isolat bakteri yang menunjukkan potensi antifungal diindikasikan oleh adanya zona hambatan yang terbentuk di sekitar tempat supernatan isolat bakteri tersebut.

Metode pengujian yang hampir sama dilakukan pada media cair. Ke dalam tabung Erlenmeyer 250 ml yang telah berisi 50 ml media PDA cair (ekstrak kentang 200 g/l, 20 g/l dekstrosa, 1 l akuades), masing-masing dikontaminasi dengan satu potongan biakan cendawan *R. solani* uji berdiameter 0,5 cm. Kemudian tiap bahan diberi perlakuan 1 ml supernatan, sedangkan untuk kontrol ditambahkan 1 ml media PDB steril. Tiap perlakuan diulang lima kali. Bahan diinkubasi dalam suhu ruang selama 10 hari. Potensi antifungal diamati dengan mengukur bobot basah dan bobot kering miselium biakan *R. solani* dihari terakhir inkubasi. Bobot basah diukur dengan cara menimbang biakan *R. solani* yang tumbuh, sedangkan bobot kering diukur setelah biakan *R. solani* dikeringkan dalam oven suhu 70°C selama 48 jam. Data percobaan dianalisis dengan sidik ragam dan uji lanjut Dunnett pada taraf 5%.

Seleksi Isolat Bakteri Antagonis Secara *In Vivo*

Seluruh isolat bakteri yang menunjukkan potensi antifungal pada uji *in vitro* diuji secara *in vivo* pada tanaman padi varietas Mekongga yang rentan terhadap penyakit hawar pelepah padi. Tiap isolat bakteri yang diuji disiapkan dengan cara membiakkan dalam tabung berisi 5 ml media LB, diinkubasi di atas *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu ruang. Perlakuan isolat bakteri antagonis diberikan sebanyak dua kali, yaitu pada saat perendaman benih dan saat patogen diinokulasikan.

Perendaman benih dilakukan selama 24 jam dengan biakan isolat bakteri antagonis, fungisida heksakonazol 1 ml/l (kontrol positif), atau dengan air steril (kontrol negatif). Sementara itu disiapkan polibag plastik bening (30 cm x 60 cm) dengan seperempat bagiannya berisi tanah steril. Bagian polibag berisi tanah ditempatkan ke dalam pot plastik (diameter 15 cm, tinggi 15 cm) sedangkan tiga per empat bagiannya yang tidak berisi tanah difungsikan sebagai *micro-chamber*. Benih yang telah direndam kemudian ditanam (25 benih/polibag), dengan ulangan 3 kali. Tanaman yang berumur 3 minggu (3-4 helai daun) djarangkan, disisakan 10 tanaman/pot, kemudian tiap tanaman diinokulasi dengan 1 potongan biakan cendawan *R. solani* (diameter 0,5 cm) yang telah dibiakkan pada media PDA (umur 3 hari) ke bagian pangkal batang tanaman dengan cara agak ditekan hingga menempel.

Perlakuan bakteri antagonis diberikan kembali dengan cara meneteskan 0,1 ml suspensi isolat bakteri antagonis ke tiap potongan koloni patogen yang baru saja diinokulasikan. Setelah itu, bagian polibag plastik transparan yang tidak diisi tanah diselimutkan menutupi tanaman padi dan beberapa tempat pada bagian ujungnya direkat dengan stapler agar terbentuk kondisi lembab. Kondisi lembab dipertahankan hingga 10 hari atau saat tanaman pada perlakuan kontrol mati. Penyiraman tanaman dilakukan melalui bagian ujung polibag plastik yang tidak direkat.

Pengamatan dilakukan terhadap keparahan, penekanan, indeks, dan kejadian penyakit. Keparahannya penyakit ditentukan dari hasil bagi posisi gejala tertinggi dari pangkal batang dengan tinggi tanaman, kemudian dikali 100%. Penekanan penyakit dihitung dari selisih rata-rata keparahan penyakit pada kontrol dengan perlakuan, dibagi rata-rata keparahan penyakit pada kontrol, kemudian dikali 100%. Indeks penyakit ditentukan berdasarkan hasil bagi jarak gejala tertinggi dari pangkal batang dengan tinggi pelepah, kemudian dikalikan 9 (Jia *et al.* 2007). Kejadian penyakit ditentukan dengan menghitung jumlah tanaman yang menunjukkan gejala hawar pelepah dibagi jumlah

tanaman yang diamati, kemudian dikalikan 100%. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan uji lanjut dengan *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) taraf 5%.

Identifikasi Isolat Bakteri

Identifikasi isolat bakteri terpilih dilakukan secara molekuler dengan melakukan sekuensing terhadap gen 16S rRNA. Persiapan sebelum proses sekuensing mengacu pada protokol kit (Genomic DNA Mini Kit, Geneaid), dengan tahapan kegiatan meliputi pembiakan isolat bakteri dan isolasi DNA. Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer universal (27F 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3' dan 1492R 5'-GGTTACCTTG TTACGACTT-3'). Campuran PCR disiapkan dalam volume 25 μ l yang mengandung 1 μ l primer F, 1 μ l primer R, 12,5 μ l mix (KAPA Taq Ready Mix, Kapa Biosystems, Amerika Serikat), 2,5 μ l ekstrak DNA, dan 8 μ l dH₂O. Kemudian amplifikasi DNA dilakukan pada mesin PCR (Swift Maxi Thermal Cycler) dengan denaturasi awal selama 1 menit pada suhu 95°C. Kemudian diikuti oleh 30 siklus denaturasi dengan suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Setelah 30 siklus berakhir, ditambah dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1% yang telah ditambahkan etidium bromid dan bufer TBE (Sambrook and Russel 2001).

Sekuensing hasil PCR dilakukan oleh perusahaan penyedia layanan sekuensing (PT Genetika Science Indonesia, Jakarta). Hasil sekuensing digunakan untuk mencari padanan sekuen 16S rRNA yang homolog pada DNA database (GenBank) dengan menggunakan program BLAST dari *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyediaan Isolat Patogen dan Bakteri Antagonis

Isolasi patogen dari contoh tanaman padi diperoleh isolat *R. solani* yang diberi kode Rs CB01 dan digunakan sebagai patogen uji. Sementara itu, isolasi bakteri antagonis dari beberapa contoh diperoleh 144 isolat bakteri, 38 isolat di antaranya dari tanah sawah, 11 isolat dari tanaman padi, 50 isolat dari tanah tegalan, 40 isolat dari tanah aliran sungai, dan 5 isolat dari air kolam.

Seleksi Bakteri Antagonis *In Vitro* dan *In Vivo*

Hasil pengujian *in vitro* pada media PDA menunjukkan bahwa 30 isolat bersifat antagonistik terhadap *R. solani*, tiga isolat di antaranya berasal dari tanaman padi, 16 isolat dari tanah sawah, 9 isolat dari tanah tegalan, dan masing-masing 1 isolat dari air kolam dan tanah aliran sungai. Potensi antifungal terbaik pada media PDA ditunjukkan oleh isolat bakteri TT47, TB60, TS127, dan BR2. Hasil pengujian pada media PDB, khususnya pada variabel pengamatan penurunan bobot kering miselium *R. solani*, menunjukkan bahwa isolat PS7, SS8, SS11, SG39, SG40, TT47, TB60, dan TB66 memberikan penekanan terbaik terhadap pertumbuhan cendawan *R. solani* (Tabel 1).

Isolat bakteri yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *R. solani* pada media padat (PDA) mengindikasikan isolat tersebut memiliki mekanisme penghambatan secara antibiosis. Isolat yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *R. solani* pada media padat dan cair (PDB) mengindikasikan isolat selain memiliki mekanisme penghambatan secara antibiosis juga memiliki mekanisme penghambatan melalui kompetisi nutrisi atau kompetisi ruang. Isolat-isolat bakteri dengan karakter demikian ditunjukkan oleh isolat TT47, TB60, TS127, dan BR2 dengan daya hambat yang kuat pada pengujian di media padat dan isolat PS7, PS8, SS11, SG39, SG40, TT47, TB60, dan TB66 dengan daya penekanan yang kuat terhadap pertumbuhan *R. solani* dalam media cair. Isolat tersebut berpotensi dikembangkan sebagai agens hayati.

Hasil pengujian secara *in vivo* di rumah kaca menunjukkan bahwa indeks penyakit hawar pelepah pada tanaman padi akibat perlakuan masing-masing isolat bakteri antagonis beragam. Perlakuan isolat SS19, TT47, dan BR2 memberikan indeks penyakit terendah dibandingkan dengan perlakuan isolat lainnya. Indeks penyakit tersebut berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, termasuk perlakuan fungsida heksakonazol. Namun, indeks penyakit pada ketiga isolat tersebut tidak berbeda nyata satu sama lain, bahkan tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (tanpa *R. solani*) (Tabel 2).

Isolat bakteri antagonis TT47 dan BR2 menunjukkan kemampuan yang konsisten, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pada tingkat *in vitro*, isolat tersebut memiliki daya hambat yang kuat terhadap pertumbuhan *R. solani*. Hal tersebut mengindikasikan kedua isolat menghasilkan senyawa antifungal yang efektif terhadap *R. solani*. Begitu juga di tingkat *in vivo*, isolat tersebut memiliki penekanan yang kuat terhadap perkembangan gejala dan kejadian penyakit hawar pelepah yang disebabkan *R. solani*. Bahkan kemampuan kedua isolat tersebut

Tabel 1. Hambatan pertumbuhan dan penurunan bobot miselium *Rhizoctonia solani* yang diberi perlakuan isolat bakteri antagonis. Bogor, 2010.

Perlakuan (Isolat bakteri antagonis)	Asal bakteri antagonis <i>R. solani</i>	Hambatan pertumbuhan miselium <i>R. solani</i> (g)	Penurunan bobot	
			Bobot basah	Bobot kering
PC3	Tanaman padi, Cianjur	++	0,2	0,01
PS7	Tanaman padi, Subang	++	1,9*	0,11*
SS8	Tanaman padi, Subang	++	2,4*	0,12*
SS10	Tanah sawah, Subang	++	2,1*	0,04
SS11	Tanah sawah, Subang	+	2,2*	0,11*
SI12	Tanah sawah, Indramayu	+	0,4	0,01
SG14	Tanah sawah, Garut	+	1,4*	0,02
SS17	Tanah sawah, Subang	+	1,1	0,06
SS19	Tanah sawah, Subang	+	1,0	0,05
SI24	Tanah sawah, Indramayu	++	0,4	0,00
SI25	Tanah sawah, Indramayu	+	0,1	0,05
SI26	Tanah sawah, Indramayu	++	1,3*	0,00
SK31	Tanah sawah, Karawang	+	1,5*	0,04
SC34	Tanah sawah, Cianjur	+	0,3	0,00
SC35	Tanah sawah, Cianjur	++	0,8	0,02
SC37	Tanah sawah, Cianjur	+	0,3	0,02
SG39	Tanah sawah, Garut	+	2,4*	0,11*
SG40	Tanah sawah, Garut	++	2,3*	0,11*
SG41	Tanah sawah, Garut	++	1,2	0,00
SC43	Tanah sawah, Cianjur	+	0,4	0,04
TT47	Tanah tegalan, Tembilahan	+++	2,3*	0,11*
AB51	Air kolam, Bogor	+	2,3*	0,09
TB53	Tanah tegalan, Bogor	+	0,7	0,00
TB57	Tanah tegalan, Bogor	+	0,3	0,02
TB60	Tanah tegalan, Bogor	+++	2,2*	0,11*
TB66	Tanah tegalan, Bogor	+	2,3*	0,11*
ASR82	Tanah aliran sungai, Rengat	+	1,0	0,06
TS126	Tanah tegalan, Sumenep	+	1,2	0,00
TS127	Tanah tegalan, Sumenep	+++	0,1	0,03
BR2	Tanah tegalan, Bogor	+++	1,3*	0,04
K-	-	-	2,7	0,17

Angka selajur yang diikuti oleh tanda bintang (*) adalah berbeda nyata dengan kontrol (K-) menurut uji Dunnet pada taraf 5%.
+ = diameter hambatan < 10 mm; ++ = diameter hambatan 10-20 mm, +++ = diameter hambatan > 20 mm.

dalam menekan perkembangan penyakit di tingkat *in vivo* melebihi kemampuan fungisida (heksakonazol) yang digunakan. Hal ini mengindikasikan kedua isolat tetap menghasilkan senyawa antifungal dalam menghambat perkembangan penyebab penyakit di tingkat *in vivo*.

Menurut Liu *et al.* (2007), penghambatan yang kuat terhadap cendawan patogen oleh filtrat biakan bakteri antagonis strain LCH001 pada uji *in vitro* disebabkan oleh adanya senyawa antifungal yang diproduksi biakan bakteri antagonis. Namun, Mew *et al.* (2004) mengingatkan bahwa efikasi isolat bakteri antagonis *in vitro* dan *in vivo* seringkali tidak konsisten di lapangan, apabila bakteri antagonis tersebut diaplikasikan pada waktu dan tempat yang berbeda. Mew *et al.* (2004) menyatakan bahwa efikasi bakteri antagonis dapat ditingkatkan dengan cara mencampurkannya dengan fungisida yang biasa digunakan untuk pengendalian penyakit hawar pelepah padi.

Sebaliknya, isolat SS19 menunjukkan daya hambat agak lemah terhadap pertumbuhan *R. solani* di tingkat *in vitro*, tetapi memiliki daya hambat cukup kuat di tingkat *in vivo*. Berarti isolat tersebut memiliki mekanisme antibiosis yang lemah dalam menghambat pertumbuhan *R. solani* secara langsung, tetapi secara tidak langsung memiliki mekanisme lain yang cukup kuat dalam menekan gejala penyakit saat diaplikasikan pada benih atau tanaman. Dengan kata lain, isolat SS19 tidak secara langsung menekan pertumbuhan atau perkembangan patogen, tetapi lebih meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen. Mekanisme ketahanan tanaman yang dipengaruhi oleh bakteri antagonis ini dikenal dengan istilah ketahanan terinduksi secara sistemik (*induced systemic resistance*) (van Loon *et al.* 1998).

Tidak semua isolat yang memiliki daya hambat kuat terhadap pertumbuhan *R. solani* di tingkat *in vitro* menunjukkan daya penekanan yang kuat juga terhadap

perkembangan gejala penyakit di tingkat *in vivo*. Isolat TB60 dan TS127 yang memiliki daya hambat kuat di tingkat *in vitro* ternyata memiliki penekanan kurang kuat terhadap gejala penyakit (indeks penyakit) di tingkat *in vivo*. Hal ini mengindikasikan isolat tersebut menghasilkan senyawa antifungal pada saat pengujian di tingkat *in vitro*, tetapi kurang dihasilkan pada saat pengujian di tingkat *in vivo*. Kemungkinan lain, kedua isolat tersebut kurang adaptif di tingkat *in vivo*, sehingga potensi antagonis yang dimilikinya kurang berperan seperti di tingkat *in vitro*. Kejadian ini kemungkinan disebabkan oleh adanya pengaruh kondisi lingkungan terhadap pertumbuhan dan perkembangan isolat yang diaplikasikan.

Pada tingkat kejadian penyakit hawar pelepah, isolat TT47 juga menunjukkan kemampuan terbaik dibandingkan dengan perlakuan bakteri antagonis lainnya. Nilai kejadian penyakit pada perlakuan isolat TT47 paling rendah (33,3%). Nilai kejadian penyakit tersebut berbeda nyata dengan perlakuan isolat bakteri lainnya, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa *R. solani* (-RS) (Gambar 1).

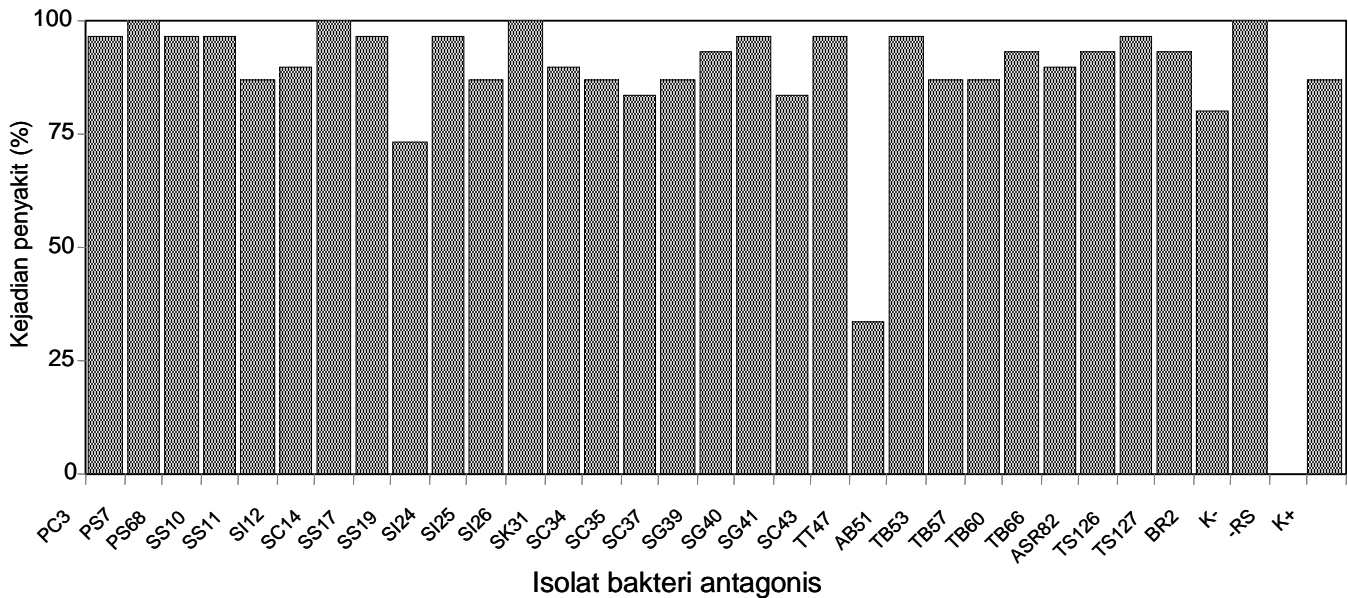
Dengan demikian, pada pengujian *in vivo* diperoleh tiga isolat bakteri antagonis yang cukup efektif menekan gejala hawar pelepah daun penyakit yang disebabkan oleh *R. solani*, yaitu isolat BR2, SS19, dan TT47. Isolat tersebut memiliki kemampuan signifikan dalam menekan keparahan, indeks (Tabel 2), dan kejadian

penyakit hawar pelepah padi (Gambar 1). Meskipun hasil pengujian ini sedikit berbeda dengan hasil pengujian bakteri antagonis di tingkat *in vitro*.

Identifikasi Bakteri Antagonis

Hasil identifikasi secara molekuler terhadap sekuens 16S rRNA dari tiga isolat bakteri antagonis terpilih yang cukup efektif terhadap *R. solani* menunjukkan bahwa isolat SS19 memiliki kesamaan 94% dengan *Serratia marcescens*, isolat TT47 memiliki kesamaan 98% dengan *Ralstonia pickettii*, dan isolat BR2 memiliki kesamaan 99% dengan *Bacillus subtilis* (Tabel 3).

Ketiga bakteri terbaik yang diidentifikasi sebagai *S. marcescens*, *R. pickettii*, dan *B. subtilis* merupakan spesies bakteri yang telah banyak dimanfaatkan dalam kehidupan manusia. Bakteri *S. marcescens* telah digunakan sebagai agens pengendali hayati penyakit hawar pelepah padi (Someya *et al.* 2003). *R. pickettii* memiliki potensi besar sebagai bioremediasi dan mampu mendegradasi sejumlah senyawa toksik (Ryan *et al.* 2007; Elango *et al.* 2006), memiliki kemampuan hidup dan tumbuh dengan cepat dalam kondisi nutrisi rendah (oligotropik) (McAlister *et al.* 2002), dan belum pernah terdeteksi sebagai patogen pada tanaman dan hewan. *B. subtilis* juga dapat dikembangkan sebagai agens pengendali hayati berbagai penyakit tanaman (Leelasuphakul *et al.* 2008; Sign *et al.* 2008; Grover *et al.* 2010).



Gambar 1. Grafik kejadian penyakit hawar pelepah tanaman padi setelah diberi perlakuan isolat bakteri antagonis, Bogor, 2011.

Tabel 2. Indeks penyakit dan penekanan penyakit hawar pelepah padi yang diberi perlakuan bakteri antagonis. Bogor, 2011.

Perlakuan (Isolat bakteri antagonis)	Asal bakteri antagonis	Indeks penyakit \pm SD	Penekanan penyakit (%)
PC3	Tanaman padi, Cianjur	7,9 \pm 1,38 a	5,9
PS7	Tanaman padi, Subang	8,4 \pm 0,42 a	0,1
PS8	Tanaman padi, Subang	6,5 \pm 1,61 ab	22,8
SS10	Tanah sawah, Subang	7,7 \pm 1,20 a	8,0
SS11	Tanah sawah, Subang	6,7 \pm 2,07 ab	20,4
SI12	Tanah sawah, Indramayu	7,1 \pm 1,59 a	16,3
SG14	Tanah sawah, Garut	7,8 \pm 0,91 a	7,6
SS17	Tanah sawah, Subang	7,3 \pm 0,85 a	12,9
SS19	Tanah sawah, Subang	3,7 \pm 1,27 abc	56,4
SI24	Tanah sawah, Indramayu	7,0 \pm 1,81 a	16,8
SI25	Tanah sawah, Indramayu	6,1 \pm 1,70 ab	27,1
SI26	Tanah sawah, Indramayu	8,0 \pm 1,05 a	4,5
SK31	Tanah sawah, Karawang	6,4 \pm 1,72 ab	24,1
SC34	Tanah sawah, Cianjur	6,7 \pm 1,97 ab	20,9
SC35	Tanah sawah, Cianjur	5,4 \pm 3,34 ab	35,9
SC37	Tanah sawah, Cianjur	5,5 \pm 2,55 ab	34,1
SG39	Tanah sawah, Garut	7,3 \pm 1,47 a	14,0
SG40	Tanah sawah, Garut	7,3 \pm 0,53 a	13,6
SG41	Tanah sawah, Garut	5,6 \pm 2,78 ab	33,4
SC43	Tanah sawah, Cianjur	8,1 \pm 0,61 a	4,4
TT47	Tanah tegalan, Tembilahan	1,7 \pm 1,52 bc	79,6
AB51	Air kolam, Bogor	8,2 \pm 0,32 a	2,9
TB53	Tanah tegalan, Bogor	6,3 \pm 2,22 ab	24,9
TB57	Tanah tegalan, Bogor	7,4 \pm 0,82 a	12,6
TB60	Tanah tegalan, Bogor	6,3 \pm 2,45 ab	25,1
TB66	Tanah tegalan, Bogor	6,7 \pm 1,52 ab	20,1
ASR82	Tanah aliran sungai, Rengat	6,5 \pm 1,85 ab	23,2
TS126	Tanah tegalan, Sumenep	8,0 \pm 0,51 a	4,7
TS127	Tanah tegalan, Sumenep	5,4 \pm 2,45 ab	36,4
BR2	Tanah tegalan, Bogor	4,3 \pm 1,58 abc	49,4
Fungisida (K+)	-	7,0 \pm 1,28 a	17,7
RS (K-)	-	8,4 \pm 0,28 a	0,0
Tanpa RS (-RS)	-	0,0 \pm 0,00 c	100

Angka selajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut DNMR pada taraf 5%.
K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif); RS (*R. solani*).

Tabel 3. Padanan sekuen 16S rRNA isolat bakteri antagonis pada GenBank DNA dengan menggunakan program BLAST.

Kode isolat	Aksesori padanan	Kemiripan (%)	Spesies
SS19	JF 317349.1	94	<i>Serratia marcescens</i>
TT47	NC 012857.1	98	<i>Ralstonia pickettii</i>
BR2	NZ CM000490.1	99	<i>Bacillus subtilis</i>

KESIMPULAN

Isolasi dan pengujian di tingkat *in vitro* dan *in vivo* memperoleh tiga isolat bakteri antagonis yang potensial sebagai agens hayati, yaitu isolat SS19, TT47, dan BR2. Ketiga agens hayati tersebut memiliki sifat antifungal dan daya penekanan terhadap penyakit hawar pelepah padi yang disebabkan oleh *R. solani*, masing-masing 56,4% (SS19), 79,7% (TT47), dan 49,4% (BR2).

Isolat TT47 dan BR2 menunjukkan efikasi yang konsisten baik di tingkat *in vitro* maupun *in vivo*, sedangkan isolat SS19 hanya memiliki kemampuan penekanan gejala penyakit yang cukup baik di tingkat *in vivo*.

Hasil identifikasi berdasarkan sekuens 16S rRNA menunjukkan isolat SS19, TT47, dan BR2 secara berturut-turut adalah *Serratia marcescens*, *Ralstonia pickettii*, dan *Bacillus subtilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Crawford, D.L., J.M. Lynch, J.M. Whipps, and M.A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *App. and Enviromen. Microbiol.* 59(11):3899-3905.
- Elango, V.K., A.S. Ligenstoffer, and B.Z. Fathepure. 2006. Biodegradation of vinyl chloride and cis-dichloroethene by a

- Ralstonia* sp. strain TRW-1. Appl Microbiol Biotechnol. 72:1270-127.
- Fotso, S., T. Mahmud, T.M. Zabriskie, D.A. Santosa, Sulastri, and P.J. Proteau. 2008. Anguciclones from an Indonesian *Streptomyces* sp. J. Natl. Prod. 71:61-65.
- Fravel D.R. 1988. Role antibiosis in the biocontrol of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 26:75-91.
- Grosch R., F. Faltin, J. Lottmann, A. Kofeet, and G. Berg. 2005. Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. Canad. J. Microbiol. 51:345-353.
- Grover M., L. Nain, S.B. Singh, and A.K. Saxena. 2010. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. Curr. Microbiol. 60:99-106.
- Jia, Y., F. Correa-Victoria, A. McClung, L. Zhu, G. Liu, Y. Wamisque, J. Xie, M. Marchetti, S.R.M., Pinson, J.N., Rutger, and J.C. Correl. 2007. Rapid determination of cultivar responses to the sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* using a micro-chamber screening method. Plant Disease 91:485-489.
- Keel, C. and G. Defago. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. P. 27-47. In: A.C. Gange, V.K. Brown (Eds.). Multitrophic Interaction in terrestrial system. Blackwell Science Oxford.
- Kim, D.S., R.J. Cook, and D.M. Weller. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat growth with reduced tillage. Phytopathology 87:551-558.
- Leelasuphakul, W., P. Hemmanee, and S. Chuenchitt. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biol. and Technol. 48:113-121.
- Liu, C.H., X. Chen, T.T. Liu, B. Lian, G. Yucheng, V. Caer, Y.R. Xue, and B.T. Wang. 2007. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* and its antifungal components. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:459-466.
- McAlister, M.B., L.A. Kulakov, J.F. O'Hanlon, M.J. Larkin, and K.L. Ogden. 2002. Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29:75-82.
- Mew, T.W., B. Cottyn, R. Pamplona, H. Barrios, L. Xiangmin, C. Zhiyi, L. Fan, N. Nilpanit, P. Arunyanart, P.V. Kim, and P.V. Du. 2004. Applying rice seed-associated antagonistic bacteria to manage rice sheath blight in developing countries. Plant Dis. 88:557-564.
- Nagarajkumar, M., J. Jayaraj, S. Muthuhrishnan, R. Bhaskaran, and R. Velazhahan. 2005. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain pfMDU2: implications for the biological control of rice sheath blight caused *Rhizoctonia solani*. Microbiol. Res. 160:291-298.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific group of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annu. Rev. Phytopathol. 25:125-143.
- Ou, S.H. 1985. Rice diseases. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey. 272-286 p.
- Pingali, P.L., C.B. Marquez, and A.C. Rola. 1995. The impact of long-term pesticide exposure on farmer health. A medical and economic analysis. P.343-390. In: Pingali, P. L., and P. A. Roger (Eds.). Impact of pesticide on farmer health and the environment. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Rustam, B. Tjahjono, Widodo, dan Supriadi. 2005. The potential of rhizospheric bacteria in controlling blood disease of banana. J. ISSAAS 11(3):128-136.
- Ryan, M.P., J.T. Pembroke, and C.C. Adley. 2007. *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. J. Appl. Microbiol. 103:754-764.
- Sambrook, J., and R. Russel. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sign, N., P. Pandey, R.C. Dubey, and D.K. Maheshwari. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus oxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:1669-1679.
- Someya, N., M. Nakajima, Watanabe, T. Hibi, and K. Akutsu. 2003. Influence of bacteria isolated from rice plants and rhizospheres on antibiotic production by the antagonistic bacterium *Serratia marcescens* strain B2. J. Gen. Plant Pathol. 69:342-347.
- Sudir dan Suparyono. 2000. Evaluasi bakteri antagonis sebagai agensia pengendali hayati penyakit hawar pelepah dan busuk batang padi. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan 19(2):1-6.
- Van Loon, L.C., P.A.H.M. Bakker, and M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-483.