

Penghambatan Pertumbuhan *Aspergillus* spp. oleh Bakteri Endofit (Growth Inhibition of *Aspergillus* spp. by Endophytic Bacteria)

Dwi N. Susilowati^{1*} dan Untung Haryono²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: d_nengsusi@yahoo.com, d.susiharyadi@gmail.com

²Universitas Pakuan, Jl. Pakuan PO Box 452, Bogor 16143 Indonesia

Diajukan: 29 Maret 2018; Direvisi: 31 Mei 2018; Diterima: 25 Juni 2018

ABSTRACT

Aspergillus spp. (*A. niger*, *A. flavus*, and *A. fumigatus*) contaminate food commodities through production of secondary metabolites (mycotoxins) and aspergillosis, and thus pose severe hazard to human and animal health. Hence, the inhibition of mycotoxin-producing fungi on agricultural storage commodities needs to be considered. The aims of this study were to evaluate endophytic bacteria isolated from rice tissues that inhibit *Aspergillus* spp. growth, as well as to characterize the selected isolates morphologically and biochemically. Dual culture and disk diffusion method tests on 155 endophytic bacteria obtained three isolates, i.e. FB-Endo 65, FB-Endo 73, and FB-Endo 95, which showed inhibition zone from 13 to 17 mm against *Aspergillus* spp. growth. The inhibition zone and quantity of antifungal compounds increased positively with the length of incubation periods from 0 to 6 days. Antifungal compounds from the three isolates were insoluble in ethyl acetate, but soluble in methanol. The methanol soluble substance(s) from FB-Endo 73 showed higher inhibition zone than that of the other isolates. This result indicated that all three isolates produced strong antifungal activity. Morphological and biochemical identifications of the isolates revealed that all isolates belonged to the genus *Bacillus* sp. Further studies include identification and production methods of antifungal compounds of those endophytic bacteria and their application on stored seeds.

Keywords: Endophytic bacteria, antifungal, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*.

ABSTRAK

Aspergillus spp. (*A. niger*, *A. flavus*, dan *A. fumigatus*) mengontaminasi komoditas pangan melalui produksi metabolit sekunder (mikotoksin) dan aspergilosis, dengan demikian sangat berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan. Oleh karena itu, penghambatan pertumbuhan fungi penghasil mikotoksin pada komoditas pertanian yang disimpan perlu dipertimbangkan. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi isolat bakteri endofit yang berasal dari jaringan tanaman padi dalam menghambat pertumbuhan *Aspergillus* spp. dan melakukan karakterisasi isolat terseleksi secara morfologis dan biokimia. Pengujian dengan metode Dual Kultur dan *Disk Diffusion* terhadap 155 isolat bakteri endofit mendapatkan tiga isolat, yaitu FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95, yang menunjukkan zona hambat terhadap pertumbuhan *Aspergillus* spp. berkisar antara 13 mm dan 17 mm. Zona hambat dan kuantitas senyawa antifungi meningkat secara positif terhadap waktu inkubasi bakteri endofit pada interval 0 hingga 6 hari. Senyawa antifungi ketiga isolat tersebut tidak larut dalam etil asetat, namun larut dalam metanol. Senyawa yang larut dalam metanol dari isolat FB-Endo 73 menunjukkan zona penghambatan yang lebih besar dibanding dengan bakteri endofit lainnya. Hasil ini menunjukkan bahwa ketiga isolat menghasilkan aktivitas antifungi yang kuat. Identifikasi karakter morfologis dan biokimia menunjukkan bahwa ketiganya termasuk ke dalam genus *Bacillus* sp. Studi lanjutan yang diperlukan antara lain identifikasi dan metode produksi senyawa antifungi bakteri endofit tersebut dan aplikasinya pada benih-benih yang disimpan.

Kata kunci: Bakteri endofit, antifungi, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*.

PENDAHULUAN

Beberapa spesies anggota genus fungi *Aspergillus*, seperti *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, dan *A. parasiticus*, dapat menurunkan kualitas produk pertanian akibat kontaminasi mikotoksin yang dihasilkannya. Aflatoksin, mikotoksin yang dihasilkan oleh beberapa strain *A. flavus* dan *A. parasiticus*, bersifat karsinogenik, genotoksik, teratogenik, nefrotoksik, dan hepatotoksik, dan menyebabkan gangguan reproduksi dan imunosupresi yang berbahaya bagi manusia (Regnard et al. 2000; Kowalska et al. 2017). Selain mikotoksin, spora *A. fumigatus* juga membahayakan kesehatan karena dapat menyebabkan aspergilosis berupa gejala gangguan pernafasan pada manusia dan burung (Beernaert et al. 2010).

Pertumbuhan fungi penghasil mikotoksin ini dapat dihambat secara fisik (dengan aerasi, pendinginan, dan modifikasi atmosfer) atau fungistatik (dengan propionat, asam asetat, dan asam sorbat) (Paster et al. 1988). Metode pengendalian secara kimiawi dengan menggunakan fungisida diketahui memiliki dampak negatif terhadap lingkungan, meningkatkan populasi patogen yang resisten, dan meninggalkan residu kimia pada komoditas pangan. Cara yang efektif untuk mengendalikan fungi dengan risiko yang rendah terhadap kesehatan manusia dan lingkungan adalah dengan beralih ke pengendalian biologis menggunakan produk alami yang berasal dari tanaman ataupun mikroba. Produk alami berpotensi memiliki efikasi yang tinggi dalam menghambat produksi mikotoksin (Kalemba dan Kunicka 2003; Prakash et al. 2012). Antifungi alami asal tanaman, seperti ekstrak rempah-rempah dan herbal, telah banyak dieksplorasi dan dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan fungi sehingga produksi aflatoksin dapat dihambat (Selvi et al. 2003; Satish et al. 2007). Berbagai jenis fungi dan bakteri, seperti *Bacillus pumilus*, *B. substillis*, *Streptococcus lactis*, *Flavobacterium aurantiacum*, dan strain-strain *A. flavus* dan *A. parasiticus*, yang nontoksik dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan fungi penghasil aflatoksin dan produksi aflatoksin (Ruiqian et al. 2004). Hasil-hasil tersebut memberikan indikasi adanya potensi penggunaan bakteri antagonis dalam mengendalikan kerugian akibat fungi *Aspergillus*.

Bakteri endofit dapat ditemukan di dalam jaringan semua spesies tanaman dan memberikan kontribusi pada tanaman inangnya dengan menghasilkan senyawa alami untuk perlindungan dan kelangsungan hidup tanaman (Ryan et al. 2008). Sejumlah besar produk alami yang memiliki aktivitas antimikroba berhasil diisolasi dari bakteri endofit sehingga membuka

peluang pemanfaatannya sebagai sumber baru untuk produksi antibiotik (Yu et al. 2010). Metabolit antimikroba dari endofit dapat berupa alkaloid, peptida, steroid, terpenoid, sterol, quinon, dan flavonoid (Yu et al. 2010). Tujuan penelitian ini ialah mengevaluasi isolat bakteri endofit yang berasal dari jaringan tanaman padi dalam menghambat pertumbuhan *Aspergillus* spp. dan melakukan karakterisasi isolat terseleksi secara morfologis dan biokimia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor.

Perbanyakkan Bakteri Endofit dan Fungi Uji

Sebanyak 155 isolat bakteri endofit digunakan dalam penelitian ini. Isolat tersebut merupakan koleksi *Biogen Culture Collection* (Biogen CC) hasil isolasi dari jaringan tanaman padi pada penelitian sebelumnya (Susilowati, data tidak dipublikasikan). Bakteri endofit ditumbuhkan pada media King's B sambil digoyang di dalam *incubator shaker* 28°C dengan kecepatan 150 rpm selama 12 jam.

Fungi uji yang digunakan terdiri atas *A. niger*, *A. flavus*, dan *A. fumigatus* yang diperoleh dari *Indonesian Culture Collection* (InaCC) yang dikelola oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Fungi ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) cawan petri dan diinkubasi pada 28°C selama 7 hari.

Uji Antagonis Bakteri Endofit terhadap *Aspergillus niger*

Aktivitas antagonistik isolat bakteri endofit dalam menghambat pertumbuhan *A. niger* diuji dalam dua tahap. Pada tahap pertama, seluruh isolat diuji menggunakan metode Dual Kultur. Lempengan bulat berdiameter 0,5 cm dari koloni *A. niger* ditumbuhkan di tengah PDA cawan petri, kemudian di kanan kirinya digoreskan isolat bakteri sepanjang 4 cm dengan jarak 3 cm dari pusat koloni fungi. Setiap cawan petri diinokulasi dengan empat isolat bakteri kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.

Isolat bakteri endofit penghasil senyawa antifungi, yang diketahui dari terbentuknya zona bening yang tidak ditumbuhi hifa *A. niger*, diuji lebih lanjut menggunakan metode *Disk Diffusion*. Bulatan kertas saring steril berdiameter 0,5 cm dicelupkan ke dalam kultur bakteri endofit, dikeringanginkan di atas kertas saring steril, kemudian diletakkan pada satu sisi

media PDA cawan petri. Pada sisi yang berlawanan, ditumbuhkan potongan agar *A. niger*. Lebar zona hambat yang terbentuk antara bakteri endofit dan *A. niger* diukur pada hari ketujuh setelah inkubasi. Untuk setiap perlakuan isolat bakteri, terdapat tiga ulangan dan pengujian dilakukan secara duplo. Isolat yang menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi diseleksi lebih lanjut pada pengujian berikutnya.

Uji Antagonis Bakteri Endofit Terseleksi terhadap *A. flavus* dan *A. fumigatus*

Isolat bakteri endofit terseleksi pada tahap penelitian sebelumnya diuji terhadap *A. flavus* dan *A. fumigatus* menggunakan metode *Disk Diffusion*. Untuk setiap perlakuan isolat bakteri, terdapat tiga ulangan. Isolat yang stabil menghasilkan zona hambat yang besar terhadap ketiga spesies fungi uji, saat dilakukan pengukuran pada hari ketujuh setelah inkubasi, digunakan pada tahap penelitian selanjutnya.

Pengaruh Waktu Inkubasi Bakteri Endofit terhadap Pertumbuhan *A. niger*

Isolat bakteri endofit terseleksi ditumbuhkan pada media PDA pada hari ke- 0, 2, 4, 6 sebelum inokulasi *A. niger*. Jari-jari koloni fungi diamati pada hari ketujuh setelah inokulasi *A. niger*. Pengujian antagonis bakteri endofit hanya dilakukan terhadap *A. niger* karena perkembangbiakan spesies ini relatif lebih cepat daripada kedua spesies lainnya. Waktu inkubasi bakteri endofit yang optimum untuk penghambatan pertumbuhan *A. niger* digunakan dalam preparasi dan pengujian antagonis senyawa antifungi berikutnya.

Preparasi dan Pengujian Antagonis Ekstrak Bakteri Endofit terhadap *A. flavus*

Isolat bakteri endofit terseleksi ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB), dalam waktu inkubasi optimum yang telah diketahui pada tahap penelitian sebelumnya, dengan cara digoyang dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang. Kerapatan optik dan pH kultur bakteri diukur, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm pada 4°C selama 30 menit. Supernatan diambil kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan dan suhu yang sama, selanjutnya difiltrasi dengan filter *millipore* 0,2 μm , diliofilisasi selama 30 jam, dan diekstraksi dengan etil asetat atau metanol sebanyak volume yang sama. Ekstrak kasar diencerkan dengan perbandingan 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, dan 1:16 kemudian diuji kemampuan penghambatannya terhadap *A. flavus* dengan metode *Disk Diffusion* (Irkin dan Korukluoglu 2007; de Melo et al. 2009).

Parameter yang diamati adalah kerapatan sel bakteri (OD), pH kultur, dan zona hambat yang dibentuk oleh ekstrak kultur. Selanjutnya, dilakukan pengujian bioasai pada setiap ekstrak yang telah diencerkan sebagaimana tahapan sebelumnya terhadap *A. flavus* (Bauer et al. 1966; Cho et al. 2009). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Faktorial dengan faktor jenis isolat bakteri endofit (FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95) dan konsentrasi senyawa antifungi hasil ekstraksi dengan pelarut (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, dan 1:16). Untuk setiap perlakuan isolat bakteri endofit, terdapat sembilan ulangan.

Karakterisasi Morfologi dan Biokimia Bakteri Endofit Terseleksi

Morfologi sel diamati dengan mikroskop cahaya dan morfologi koloni (bentuk koloni, margin, elevasi, warna, permukaan, dan konsistensi) diamati secara visual dari agar cawan petri. Karakterisasi biokimia yang dilakukan meliputi hidrolisis kasein, hidrolisis pati, hidrolisis lemak, hidrolisis gelatin, reduksi nitrat, metil merah, Voges-Proskauer, produksi urease, produksi indol, produksi H_2S , produksi katalase, Simmon's sitrat, fermentasi glukosa, fermentasi sukrosa, fermentasi laktosa, dan TSI agar (Sneath 1986).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Antagonis Bakteri Endofit terhadap *Aspergillus niger*

Sebanyak 12 isolat (7,7%) dari total 155 isolat bakteri endofit yang diuji positif menghambat pertumbuhan *A. niger*. Zona hambat yang dihasilkan berkisar antara 8,0 mm dan 22,3 mm (Tabel 1). Zona hambat dapat terbentuk karena senyawa antifungi yang dihasilkan oleh bakteri endofit merusak dinding sel β -*(1,3)*-glucan synthase *A. niger* dan melemahkan filamen fungi (Onishi et al. 2000). Menurut Prapagdee et al. (2008), antagonisitas bakteri terhadap fungi ini biasanya berkaitan dengan produksi senyawa antifungi dan enzim hidrolitik ekstraselular, seperti kitinase dan 1,3- β -glukanase. Enzim kitinase mampu melisis dinding sel banyak jenis fungi.

Enam isolat bakteri endofit (FB-Endo 2, FB-Endo 65, FB-Endo 73, FB-Endo 85, FB-Endo 94, dan FB-Endo 95) nyata membentuk zona hambat lebih lebar dibanding dengan enam isolat bakteri endofit lainnya (Tabel 1). Contoh penampilan dua isolat di antaranya dalam menghambat pertumbuhan *A. niger* ditampilkan pada Gambar 1.

Uji Antagonis Bakteri Endofit Terseleksi terhadap *A. flavus* dan *A. fumigatus*

Dari pengujian stabilitas hambatan enam isolat endofit terseleksi terhadap *A. flavus* dan *A. fumigatus*, diperoleh tiga isolat yang membentuk zona hambat paling lebar, yaitu FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95 (Tabel 2).

Zona hambat yang dihasilkan keenam isolat terhadap *A. flavus* dan *A. fumigatus* disebabkan oleh produksi antifungi. Produksi metabolit sekunder yang meliputi antibiotik dengan berat molekul rendah dan peptide siklik alami berkaitan dengan penghambatan pertumbuhan banyak spesies fungi (Romero et al. 2007).

Pengaruh Waktu Inkubasi Bakteri Endofit terhadap Pertumbuhan *A. niger*

Pengujian lebih lanjut terhadap ketiga isolat bakteri (FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95) yang konsisten menghambat pertumbuhan ketiga spesies

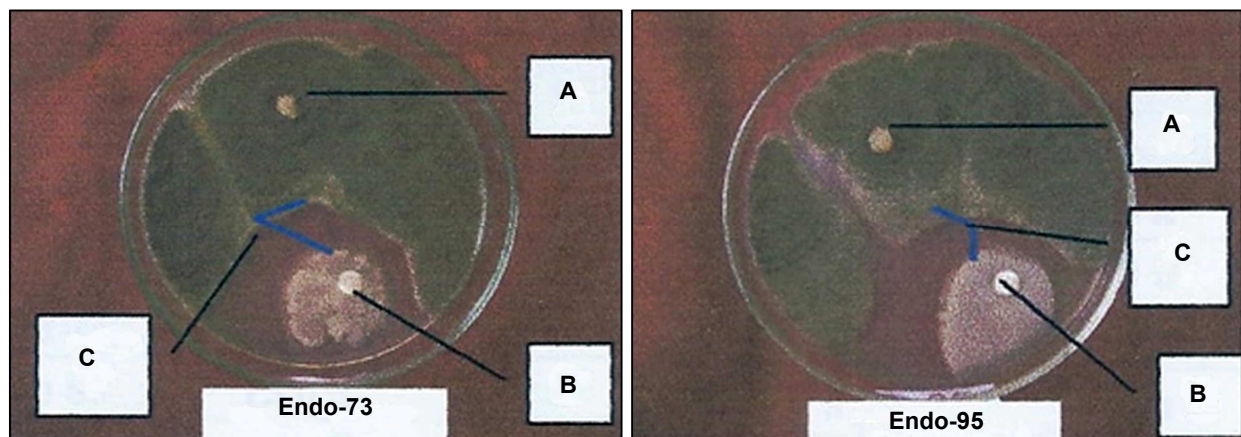
Aspergillus menunjukkan bahwa pada interval 0 sampai 6 hari setelah inokulasi bakteri, pertumbuhan koloni fungi semakin tertekan jika diinkubasi lebih lama (Gambar 2). Pada hari kedua, bakteri endofit diduga telah menyekresikan senyawa antifungi hingga konsentrasi yang menyebabkan pertumbuhan koloni fungi terhambat.

Waktu inkubasi optimum bakteri endofit pada penelitian ini dicapai pada hari keenam. Sementara itu, Liswara (2000) melaporkan bahwa bakteri endofit ICBB 1171 menyekresi senyawa antibiotik dan mencapai titik optimum pada hari keempat, sedangkan Yoshida et al. (2001) melaporkan bahwa antibiotik iturin A2 diproduksi oleh *B. amyloliquefaciens* RC-2 sejak kultur berumur 12 jam. Masa inkubasi ini jauh lebih cepat dibanding dengan produksi antifungi *Streptomyces humides* strain S5-55 untuk menghambat pertumbuhan *Phytophthora capsici* dan *Magnaporthe grisea* yang membutuhkan waktu inkubasi selama 14 hari (Hwang et al. 2001).

Tabel 1. Hasil uji antagonis bakteri endofit terhadap *Aspergillus niger* dengan metode Dual Kultur.

No.	Kode isolat	Zona hambat (mm)
1.	FB-Endo 1	14,0 b
2.	FB-Endo 2	18,5 d
3.	FB-Endo 25	14,0 b
4.	FB-Endo 26	16,0 c
5.	FB-Endo 65	20,5 e
6.	FB-Endo 73	22,3 e
7.	FB-Endo 85	21,5 e
8.	FB-Endo 91	8,0 a
9.	FB-Endo 94	19,0 de
10.	FB-Endo 95	21,5 e
11.	FB-Endo 104	12,5 b
12.	FB-Endo 134	12,5 b

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata ($p = 0,05$).



Gambar 1. Contoh penampilan isolat bakteri endofit yang mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger*. Endo-73 = isolat FB-Endo 73, Endo-95 = isolat FB-Endo 95, A = *A. niger*, B = bakteri endofit, C = zona hambat.

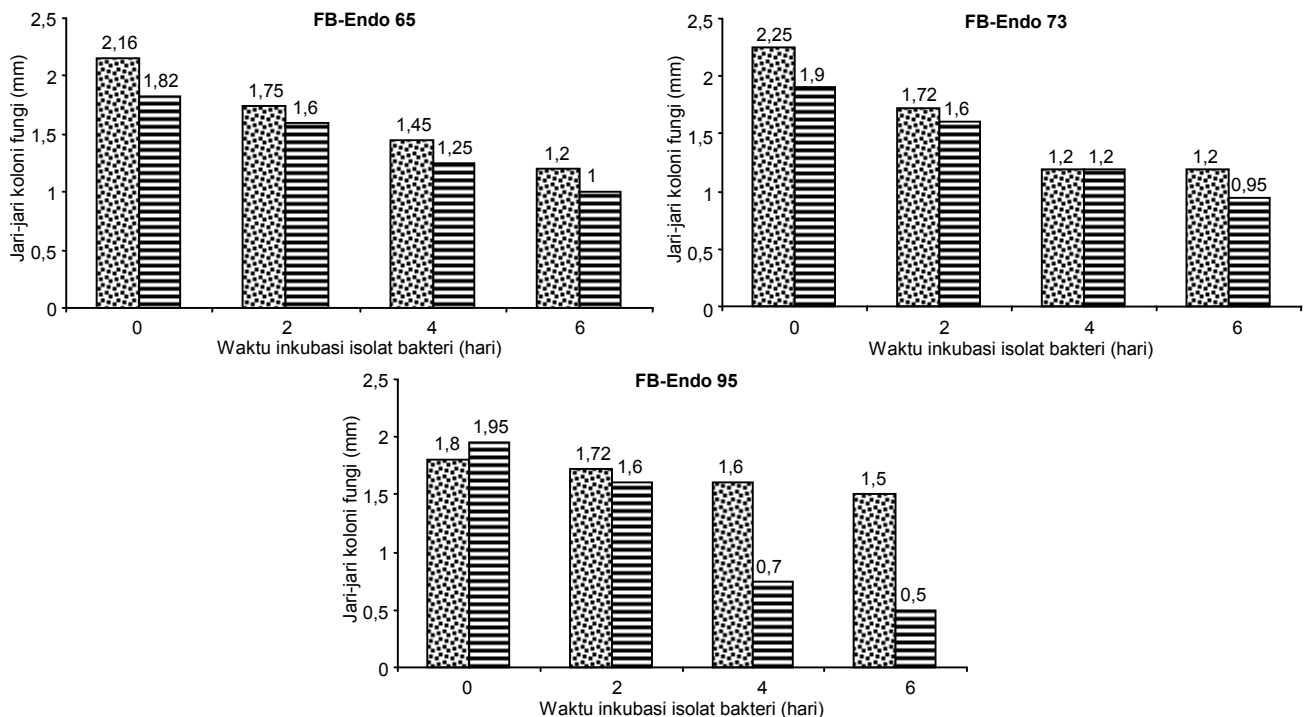
Preparasi dan Pengujian Antagonis Ekstrak Bakteri Endofit terhadap *A. flavus*

Kultur FB-Endo 73 memiliki nilai kerapatan optik sebesar 1,510, lebih rendah dibanding dengan nilai kerapatan optik kultur FB-Endo 65 dan FB-Endo 95 yang berturut-turut sebesar 1,896 dan 1,850 (Gambar 3).

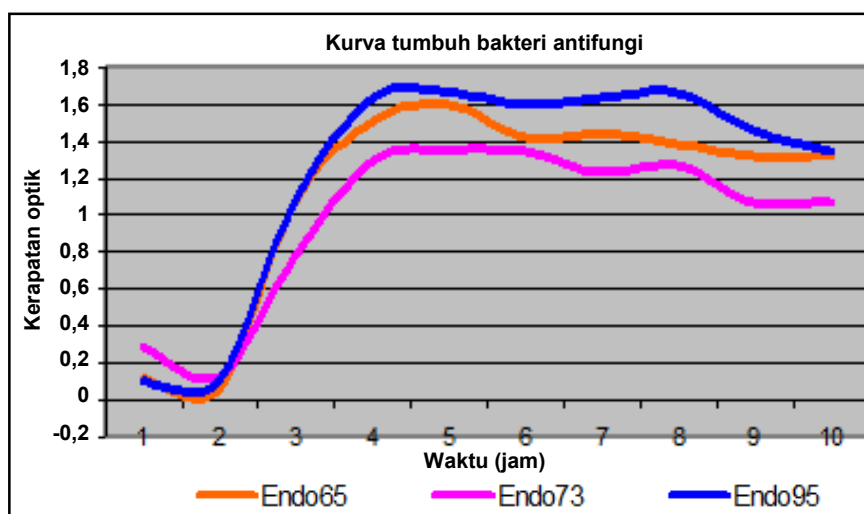
Hasil pengukuran pH menunjukkan bahwa kultur FB-Endo 65 dan FB-Endo 95 memiliki pH yang

sama yaitu 6,7, sedangkan kultur FB-Endo 73 memiliki pH 6,8. Hal ini menunjukkan bahwa media tumbuh bakteri tidak mengalami pengasaman oleh metabolit sekunder bakteri yang disekresikan sehingga antifungi yang dihasilkan tidak bersifat asam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat pada semua konsentrasi tidak dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus* dan hal ini menunjukkan bahwa senyawa antifungi tidak larut dalam pelarut etil asetat.



Gambar 2. Penghambatan pertumbuhan koloni *A. niger* oleh tiga isolat bakteri endofit pada interval 0 hingga 6 hari pada media PDA.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan tiga isolat bakteri endofit pada media King's B pada 28°C diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm. Endo65 = isolat FB-Endo 65, Endo73 = isolat FB-Endo 73, Endo95 = isolat FB-Endo 95.

Analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan isolat berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap penghambatan pertumbuhan *A. flavus*, sedangkan pengenceran ekstrak metanol pada semua konsentrasi tidak berpengaruh nyata. Tidak ada pengaruh interaksi antara perlakuan isolat dan pengenceran ekstrak metanol (Tabel 3).

Rataan jari-jari koloni *A. flavus* yang mengarah ke ekstrak metanol pada FB-Endo 73 lebih kecil daripada FB-Endo 65 atau FB-Endo 95. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak senyawa antifungi FB-Endo 73 lebih kuat dibanding dengan lainnya. Berdasarkan hasil pengukuran kerapatan sel bakteri FB-Endo 73 yang lebih rendah daripada FB-Endo 65 dan FB-Endo 95, jelas terlihat bahwa FB-Endo 73 memiliki kemampuan menghasilkan antifungi yang lebih besar. Phister et al. (2004) melaporkan bahwa *Bacillus sp.* strain CS93 menghasilkan tiga antibiotik dalam media

yang sama, yaitu iturin, basilisin, dan klorotetain.

Karakterisasi Morfologi dan Biokimia Isolat FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95

Sel bakteri endofit FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95 berbentuk batang dan membentuk endospora. Semua isolat yang diuji menunjukkan sifat gram positif. Hasil pengujian karakter morfologis dan biokimia disajikan pada Tabel 4.

Karakterisasi morfologi menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri endofit terseleksi termasuk ke dalam genus *Bacillus sp.* Karakterisasi molekuler baru dilakukan terhadap isolat FB-Endo 65 dan diketahui memiliki kemiripan sebesar 97% dengan *B. subtilis* (Susilowati et al. 2010; Hidayatun et al. 2011).

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh spesies dan strain tertentu dari genus *Bacillus* memiliki aktivitas antibakteri dan/atau antifungi terhadap mikroba

Tabel 3. Penghambatan jari-jari *A. flavus* oleh ekstrak metanol senyawa antifungi tiga isolat bakteri endofit pada berbagai konsentrasi.

Kode isolat	Jari-jari <i>A. flavus</i> (mm)					Rataan
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
FB-Endo 65	10,10	10,00	10,40	10,40	10,20	10,22 a
FB-Endo 73	9,10	9,40	9,10	9,95	9,95	9,32 b
FB-Endo 95	8,60	9,50	9,70	10,00	9,60	9,48 ab
Rataan	9,27 a	9,63 a	9,73 a	9,97 a	9,77 a	

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata. Pada taraf uji $P = 0,05\%$.

Tabel 4. Karakter morfologis dan biokimia bakteri endofit FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95.

Karakter	Isolat FB-Endo 65	Isolat FB-Endo 73	Isolat FB-Endo 95
Makroskopis koloni	Tidak beraturan, bertepi, tepian seperti benang-benang, ketinggian nyata terlihat namun rata pada seluruh permukaan, keruh	Bentuknya seperti akar, tepian seperti benang-benang, ketinggian nyata terlihat namun rata pada seluruh permukaan, keruh	Tidak beraturan, bertepi, tepian bergelombang, ketinggian nyata terlihat namun rata pada seluruh permukaan, keruh
Mikroskopis sel	Sel berbentuk batang, gram positif, menghasilkan endospora	Sel berbentuk batang, gram positif, menghasilkan endospora	Sel berbentuk batang, gram positif, menghasilkan endospora
Motilitas	Motil	Nonmotil	Motil
Biokimia			
Hidrolisis kasein	Positif	Positif	Positif
Hidrolisis pati	Positif	Positif	Positif
Hidrolisis lemak	Positif	Positif	Negatif
Hidrolisis gelatin	Positif	Positif	Positif
Reduksi nitrat	Positif	Positif	Positif
Metil merah	Positif	Positif	Positif
Voges-Proskauer	Negatif	Negatif	Negatif
Produksi urease	Negatif	Negatif	Negatif
Produksi indol	Negatif	Negatif	Negatif
Produksi H ₂ S	Negatif	Negatif	Negatif
Produksi katalase	Positif	Positif	Positif
Simmon's sitrat	Negatif	Negatif	Negatif
Fermentasi glukosa	Positif	Positif	Positif
Fermentasi sukrosa	Negatif	Positif	Positif
Fermentasi laktosa	Negatif	Negatif	Negatif
TSI agar	Positif	Positif	Positif
Perkiraan hasil identifikasi	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>

patogen tanaman atau bahan pangan (Smirnov et al. 1986). Banyak strain *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, dan *B. circulans* diketahui dapat menekan pertumbuhan fungi secara *in vitro* dengan menghasilkan antifungi berupa lipopeptida siklik yang disintesis nonribosomal, yaitu surfaktin, iturin, dan fengisin (Cho et al. 2003, 2009; Das et al. 2008; Caldeira et al. 2011; Ji et al. 2013; Afsharmanesh et al. 2014; Gong et al. 2015). Iturin yang dimurnikan dari *B. pumilus* strain HY1 menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *A. flavus* dan *A. parasiticus* (Cho et al. 2009). Lipopeptida ini merupakan biosurfaktan bersifat ampifilik dan sebagai antibiotik golongan peptida yang memiliki aktivitas antifungi sehingga dapat digunakan sebagai biopestisida untuk perlindungan tanaman dan bahan pascapanen yang bersifat ramah lingkungan karena mudah didegradasi di dalam tanah (Caldeira et al. 2011).

Pada penelitian ini, potensi penghambatan pertumbuhan *Aspergillus* spp. oleh ketiga isolat bakteri endofit tersebut baru diketahui sebatas secara *in vitro*. Penelitian lanjutan masih diperlukan untuk mengetahui jenis dan produksi senyawa antifungi yang disekresikan serta aplikasinya pada benih-benih hasil pertanian yang telah disimpan.

KESIMPULAN

Evaluasi dan karakterisasi terhadap 155 isolat bakteri endofit tanaman padi menghasilkan tiga isolat yang memproduksi senyawa antifungi. Isolat tersebut adalah FB-Endo 65, FB-Endo 73, dan FB-Endo 95 yang memiliki kestabilan zona hambat pertumbuhan *A. niger* secara *in vitro*. Waktu inkubasi optimum produksi senyawa antifungi adalah 6 hari. Fraksi terlarut metanol isolat FB-Endo 73 menghasilkan zona hambat lebih lebar daripada isolat FB-Endo 65 dan FB-Endo 95. Ketiga isolat tersebut memiliki kemiripan sebagian sifat dengan *Bacillus* sp. Studi lanjutan diperlukan untuk identifikasi dan mendapatkan metode produksi senyawa antifungi isolat bakteri endofit tersebut dan aplikasinya pada benih-benih yang disimpan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Karden Mulya atas ide dan saran selama penelitian berlangsung, Siti Aminah dan Jajang Kosasih atas bantuan teknis di laboratorium, dan Mamik Setyowati atas dukungan dalam penyelesaian naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M. & Behboudi, K. (2014) Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma irradiation. *Crop Protection*, 60, 83–92.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. & Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493–496.
- Beernaert, L.A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F. & Martel, A. (2010) *Aspergillus* infections in birds: A review. *Avian Pathology*, 39 (5), 325–331.
- Caldeira, A.T., Arteiro, J.M.S., Coelho, A.V. & Roseiro, J.C. (2011) Combined use of LC–ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051. *Process Biochemistry*, 46 (9), 1738–1746.
- Cho, S.J., Lee, S.K., Cha, B.J., Kim, Y.H. & Shin, K.S. (2003) Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters*, 223 (1), 47–51.
- Cho, K.M., Math, R.K., Hong, S.Y., Islam, S.M.A., Mandanna, D.K., Cho, J.J., Yun, M.G., Kim, J.M. & Yun, H.D. (2009) Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control*, 20 (4), 402–406.
- Das, P., Mukherjee, S. & Sen, R. (2008) Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (6), 1675–1684.
- de Melo, F.M.P., Fiore, M.F., de Moraes, L.A.B., Silva-Stenico, M.G., Scramin, S., de Araujo-Teixeira, M. & de Melo, I.S. (2009) Antifungal compounds produced by cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Scientia Agricola*, 66 (5), 583–592.
- Gong, A.D., Li, H.P., Yuan, Q.S., Song, X.S., Yao, W., He, W.J., Zhang, J.B. & Liao, Y.C. (2015) Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLOS One*, 10 (2), e0116871. doi:10.1371/journal.pone.0116871.
- Hidayatun, N., Susilowati, D.N. & Mulya, K. (2011) Identifikasi 26 isolat bakteri endofitik dan filosfer padi dengan analisis sekuen 16S rDNA. *Berita Biologi*, 10 (4), 455–461.
- Hwang, B.K., Lim, S.W., Kim, B.S., Lee, J.Y. & Moon, S.S. (2001) Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3739–3745.
- Inkin, R. & Korukluoglu, M. (2007) Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion, and leek extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6 (4), 384–387.

- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.S. & Yu, S.H. (2013) Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, 41 (4), 234–242.
- Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10), 813–829.
- Kowalska, A., Walkiewicz, K., Koziel, P. & Muc-Wierzoń, M. (2017) Aflatoxins in animal and human health. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71 (0), 315–327.
- Liswara, N. (2000) *Karakterisasi senyawa antibiotik yang resisten terhadap β-laktamase tipe TEM-1, dari isolat ICBB 1171 asal ekosistem air hitam, Kalimantan Tengah*. Tesis S2, Institut Pertanian Bogor.
- Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A. & Kong, L. (2000) Discovery of novel antifungal (1, 3)-β-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (2), 368–377.
- Paster, N., Juven, B.J. & Harshemesh, H. (1988) Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B-1 formation by olive plant tissue constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 64, 293–297.
- Phister, T.G., O'Sullivan, D.J. & McKay, L.L. (2004) Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1), 631–634.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2012) Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Research International*, 49 (1), 201–208.
- Prapagdee, B., Kuekulvong C.H., & Mongkolsuk, S. (2008) Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4, 330–337.
- Regnard, J.F., Icard, P., Nicolosi, M., Spaggiari, L., Magdeleinat, P., Jauffret, B. & Levasseur, P. (2000) Aspergilloma: A series of 89 surgical cases. *The Annals of Thoracic Surgery*, 69 (3), 898–903.
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J.L., Davila, J.C. & Perez-Garcia, A. (2007) Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 969–976.
- Ruiqian, L., Qian, Y., Thanaboripat, D. & Thansukon, P. (2004) Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *KMITL Science Journal*, 4, 132–155.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. (2008) Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278 (1), 1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x.
- Satish, S., Mohana, D.C., Raghavendra, M.P. & Raveesha, K.A. (2007) Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *International Journal of Agricultural Technology*, 3 (1), 109–119.
- Selvi, A.T., Joseph, G.S. & Jayaprakasha, G.K. (2003) Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiology*, 20, 455–460.
- Smirnov, V.V., Reznik, S.R. & Vasilievskaya, I.A. (1986) *Aerobe Endospore-Forming Bacteria*. Budapest: Medicina Konyvkiado.
- Sneath, P.H.A. (1986) Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Baltimore: William & Wilkins. 1104–1207.
- Susilowati, D.N., Hidayatun, N., Tasliyah & Mulya, K. (2010) Keragaman bakteri endofitik pada empat jenis varietas padi dengan metode ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*). *Berita Biologi*, 10 (2), 241–248.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. & Shirata, A. (2001) Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91 (2), 181–187.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. & Qin, L. (2010) Recent development and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165, 437–449.