

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Endofitik Penghambat Jamur Patogen Padi

Yadi Suryadi^{1*}, Tri P. Priyatno¹, I Made Samudra¹, Dwi N. Susilowati¹, Patricia², dan Wahyu Irawati²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: yshid@yahoo.co.uk

²Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika UPH-Karawaci Tangerang

Diajukan: 8 Februari 2013; Diterima: 31 Mei 2013

ABSTRACT

Characterization and Identification of Endophytic Bacterial Isolates Suppressing Rice Fungal Pathogen. Yadi Suryadi, Tri P. Priyatno, I Made Samudra, Dwi N. Susilowati, Patricia, and Wahyu Irawati. Disease caused by fungal pathogens often causing damage on rice crop. This study was aimed to characterize 10 endohytic bacterial isolates in suppression of rice pathogenic fungi. Characterization by *in vitro* test showed several endophytic isolates effective against fungal pathogen *Rhizoctonia solani* (*Rs*) and *Pyricularia oryzae* (*Po*). The bacterial culture filtrates could inhibit radial growth of fungal colonies with the *Rs* ranged percentage inhibition of 32.9-99.4%, whilst inhibition against *Po* were ranged from 3-98.2%, respectively. Based on chitinase assay, it was indicated that gram negative bacteria of E 76 isolate produced clear zone and highest chitinolytic index. The analysis to the base sequence (total 1,322 bp) using 16s rRNA gene sequencing revealed that E76 isolates had 99% similarity with *Burkholderia* sp.

Keywords: Rice, endophytic bacteria, blast, sheath blight, biocontrol, characterization.

ABSTRAK

Penyakit yang disebabkan oleh jamur patogen sering merusak tanaman padi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi 10 isolat bakteri endofitik terhadap penghambatan jamur patogen pada tanaman padi. Karakterisasi isolat endofitik secara *in vitro* menunjukkan beberapa isolat endofitik efektif menekan jamur patogen *Rhizoctonia solani* (*Rs*) dan *Pyricularia oryzae* (*Po*). Bakteri dalam bentuk kultur filtrat mampu menghambat pertumbuhan koloni jamur, masing-masing dengan tingkat penghambatan terhadap *Rs* berkisar 32,9-99,4% dan penghambatan *Po* 3-98,2%. Hasil uji kitinase terhadap isolat Gram negatif E76 menghasilkan zona bening dan indeks kitinolitik tertinggi. Hasil analisis terhadap urutan basa gen 16s rDNA (1.322 bp) menunjukkan isolat E76 memiliki kemiripan basa 99% dengan *Burkholderia* sp.

Kata kunci: Padi, bakteri endofitik, blas, hawar pelepah daun, biokontrol, karakterisasi.

PENDAHULUAN

Patogen utama dari kelompok jamur yang sering merusak tanaman padi di antaranya adalah *Rhizoctonia solani* (*Rs*) penyebab penyakit hawar pelepah daun (HPD) dan *Pyricularia oryzae* (*Po*) penyebab penyakit blas. Kedua jamur ini merugikan petani padi (Van *et al.*, 2001). Penyakit blas menimbulkan dua gejala khas, yaitu blas daun dan blas leher. Blas daun mempunyai gejala bercak coklat kehitaman, berbentuk belah ketupat dengan pusat bercak berwarna putih. Blas leher mempunyai gejala bercak coklat kehitaman pada pangkal leher batang padi yang dapat mengakibatkan leher malai tidak mampu menopang malai sehingga mudah patah (Gouramanis, 1999). Penyakit HPD menyebabkan tanaman mudah rebah dan gabah tidak terisi penuh, bahkan hampa (Dorrance dan Mills, 2010). Patogen penyebab penyakit HPD berasal dari tanah dan menyebar secara alami. Sklerotia jamur dapat bertahan di dalam tanah dan menyebar secara luas dengan bantuan air irigasi (Kazempour, 2004).

Fungisida yang diaplikasikan secara luas untuk mengatasi penyakit HPD dan blas berdampak negatif, di antaranya meningkatnya resistensi patogen, residu kimia yang bersifat toksik, polusi lingkungan lahan pertanian, biaya mahal, dan mengganggu kesehatan manusia (Sehajpal *et al.*, 2009). Pengendalian ramah lingkungan untuk menghasilkan tanaman sehat dan memiliki kualitas tinggi perlu dikembangkan untuk mengatasi dampak negatif penggunaan fungisida. Salah satu alternatif pengendalian terbaik adalah penggunaan agen biokontrol berupa bakteri antagonis (Ardakani *et al.*, 2010). Penggunaan bakteri sebagai agen biokontrol diharapkan dapat menghambat pertumbuhan jamur

patogen padi seperti *Rs* dan *Po* (Van *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2005; Yuliar, 2008).

Bakteri endofitik telah dikembangkan sebagai agen biokontrol karena memiliki beberapa kelebihan, antara lain mikroorganismenya ini banyak terdapat di tanah/jaringan tanaman sehat, produksi massal lebih mudah dan lebih cepat daripada mikroorganismenya lain seperti jamur. Beberapa genus bakteri sebagai agen biokontrol yang pernah dilaporkan adalah *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, dan *Streptomyces*. Bakteri *Pseudomonas* dan *Bacillus* sering dimanfaatkan sebagai agen biokontrol (Montealegre *et al.*, 2003).

Beberapa isolat bakteri endofitik yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari koleksi penyimpanan jangka panjang Bank Gen Mikroba Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) yang belum diidentifikasi maupun dikarakterisasi potensinya sebagai mikroba yang bermanfaat dibidang pertanian. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi 10 isolat bakteri endofitik yang mampu menghambat jamur patogen pada tanaman padi dan identifikasi terhadap isolat terpilih.

BAHAN DAN METODE

Peremajaan Isolat Endofitik dan Morfologi Bakteri Endofitik

Sepuluh isolat endofitik koleksi Biogen CC dalam bentuk ampul liofilisasi (Tabel 1) disuspensi dengan 100 µl air steril, kemudian disebarkan ke dalam cawan petri yang berisi media *nutrient agar*

(NA) masing-masing dengan dua ulangan, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 28°C. Koloni tunggal yang tumbuh dalam cawan petri diinokulasikan ke dalam media NA miring masing-masing tiga ulangan, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 28°C.

Pengamatan koloni dilakukan dengan melihat warna koloni, sedangkan pengamatan morfologi sel dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 40-100 x. Untuk uji Gram, sebanyak 1 ose bakteri diambil dan dicampur secara merata dengan KOH3% yang telah diletakkan pada kaca objek. Pengamatan dilakukan dengan cara melihat ada tidaknya filamen seperti lendir yang dihasilkan (Agarwal *et al.*, 1989).

Uji Dual Culture Bakteri Endofitik dengan Jamur *Rs* dan *Po*

Jamur *Rs* dan *Po* ditumbuhkan pada media *potato dextrose agar* (PDA) dalam cawan petri. Koloni jamur diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang. PDA pada cawan petri berdiameter 9 cm dilubangi menggunakan *cork borer* pada jarak 3 cm dari tepi cawan. Kepingan bulat *Rs* atau *Po* diambil dengan jarum ose dan diletakkan pada media PDA yang telah dilubangi tersebut. Isolat endofitik yang disiapkan dari sel utuh bakteri diuji dengan cara digoreskan pada jarak 3 cm dari jamur *Rs* atau *Po* dan panjang goresan 4 cm mengikuti prosedur Amal *et al.* (2005). Inkubasi dilakukan selama 5-7 hari pada suhu kamar dan dilihat efek antagonis isolat endofitik terhadap pertumbuhan miselia *Rs/Po*. Sebagai pembanding digunakan jamur *Rs/Po* dengan goresan berupa air steril.

Tabel 1. Sumber isolat bakteri endofitik koleksi Biogen CC yang digunakan.

Isolat bakteri	Asal inang	Asal isolat	Tahun koleksi
E63	Padi, Cirata	Sukabumi	2004
E64	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E65	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E66	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E68	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E73	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E76	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E94	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E95	Padi, Limboto	Sukabumi	2004
E130	Padi, Limboto	Sukabumi	2004

Uji *Dual Culture* Filtrat Bakteri Endofitik dengan Jamur *Rs* dan *Po*

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam 10 ml media NB dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Kultur sebanyak 1,5 ml dimasukkan ke dalam *ependorff* steril dan disentrifugasi selama 5 menit dengan putaran 10.000 rpm. Supernatan/filtrat hasil sentrifugasi digunakan untuk uji *dual culture* mengikuti prosedur Nalisha *et al.* (2006). Supernatan sebanyak 100 µl dilarutkan pada cawan petri sampai merata dengan media PDA yang belum memadat. Suspensi dibiarkan sampai mengeras, kemudian jamur yang telah dilubangi menggunakan *cork borer* diambil dan diletakkan pada bagian atas PDA. Inkubasi dilakukan selama 5-7 hari pada suhu kamar dan diamati pengaruh antagonis isolat endofitik terhadap pertumbuhan miselia *Rs/Po*. Sebagai pembanding adalah jamur *Rs/Po* yang diletakkan di atas campuran air steril dan media PDA. Tingkat penghambatan dihitung dengan rumus Udomsilp *et al.* (2009) dengan formula $IP = C-T/C \times 100\%$, di mana IP = indeks penghambatan, C = pertumbuhan patogen pada kontrol, T = pertumbuhan patogen pada perlakuan *dual culture*.

Uji Kitinase

Uji kitinase dilakukan mengikuti metode Spindler (1997). Suspensi bakteri dibuat dengan menginokulasikan satu ose biakan isolat ke dalam 100 µl air steril. Suspensi bakteri sebanyak 5 µl diteteskan pada empat kuadran cawan petri yang berisi media kitin padat (125 ml koloid kitin, 0,65 g Na₂HPO₄·2H₂O, 1,5 g KH₂PO₄, 0,25 g NaCl, 0,5 g NH₄Cl, 0,12 g MgSO₄·7H₂O, 0,005 g CaCl₂, dan 20 g *bacto agar*). Suspensi dalam cawan petri dibiarkan mengering selama 24 jam dalam ruang *laminar*, kemudian diinkubasi selama 6-7 hari. Selanjutnya pewarna *congo red* 0,1% dituangkan ke dalam cawan petri sampai seluruh permukaan media tertutup dengan warna merah dan dibiarkan mengering. Pengamatan zona bening yang dihasilkan dilakukan setelah perlakuan mencapai masa inkubasi 24 jam.

Isolasi DNA Genom dan Amplifikasi 16s rDNA

Identifikasi dan karakterisasi isolat endofitik dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16s rDNA

dan mengurutkan basa nukleotida gen 16s rDNA (Sun *et al.*, 2008). Isolasi DNA mengikuti metode Drancourt *et al.* (2000). Sebanyak 5 ml kultur bakteri disentrifus selama 1 menit dengan putaran 10.000 rpm. *Pellet* yang dihasilkan diresuspensi dengan larutan yang mengandung 50 mM glukosa; 25 mM Tris-HCl pH 8 dan 10 mM EDTA pH 8, kemudian divortex. Suspensi ditambahkan dengan larutan 0,2N NaOH dan 1% SDS, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Suspensi ditambahkan dengan 350 µl larutan 5M potasium asetat, kemudian disentrifus selama 10 menit dengan putaran 10.000 rpm. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan 750 µl isopropanol, kemudian diinkubasi selama 10 menit. Campuran disentrifus selama 5-10 menit pada putaran 10.000 rpm. Supernatan dibuang dan ditambahkan 500 µl etanol 70% kemudian disentrifus kembali selama 5 menit pada putaran 10.000 rpm. *Pellet* disuspensikan pada 20 µl bufer TE.

Reaksi PCR sebanyak 20 µl terdiri atas dua kali KAPA *Taq*, dan masing-masing primer sekuen *forward* (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan *reverse* (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Kondisi reaksi PCR 29 siklus meliputi tahap predenaturasi pada 94°C selama 5 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit 30 detik, *primer annealing* pada 55°C selama 45 detik, *extension* pada 72°C selama 1 menit, dan *final extension* pada 72°C selama 1 menit. Data urutan basa nukleotida dianalisis dengan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil urutan basa gen 16s rDNA selanjutnya dianalisis menggunakan ClustalW dengan program PHYLIP dan pohon filogenetik dibuat menggunakan MEGA4. Penyusunan dianalisis dengan bootstrap sebanyak 100 untuk mengulang pencarian basa yang sama sebanyak 100 kali (Edwards *et al.*, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Bakteri Endofitik

Hasil pengamatan terhadap warna koloni dan bentuk sel bakteri endofitik disajikan pada Tabel 2. Bentuk sel didominasi oleh sel berbentuk batang/basil. Koloni terdiri dari dua warna utama, yaitu

kuning dan putih. Bakteri endofitik merupakan bakteri yang hidup di jaringan tanaman pada keseluruhan siklus hidupnya tanpa menyebabkan gejala yang merugikan tanaman. Bakteri mampu merangsang pertumbuhan tanaman dan meningkatkan resistensi terhadap beberapa jamur patogen melalui produksi antibiotik (Bandara *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2001). Bakteri endofitik dapat ditemukan secara luas pada berbagai spesies tanaman dan dapat diisolasi dari permukaan jaringan tanaman atau jaringan internal tanaman (Sun *et al.*, 2008). Bakteri endofitik memasuki jaringan tanaman melalui akar, batang, dan kotiledon, terlokalisasi pada titik masuk atau menyebar ke seluruh tanaman dan tinggal di dalam sel, interselular, atau sistem vaskular (Zinniel *et al.* 2002).

Uji reaksi Gram menggunakan KOH 3% menunjukkan adanya bakteri Gram negatif dan positif melalui ada tidaknya suspensi kental seperti lendir. Bakteri Gram positif tidak menghasilkan lendir, sedangkan sel bakteri Gram negatif berlendir karena penambahan KOH 3% dapat mendestruksi dinding sel (Marlina, 2008). Kobayashi dan Palumbo (2000) mengemukakan bahwa bakteri Gram positif maupun negatif dapat diisolasi dari berbagai tipe jaringan tanaman dan jenis tanaman.

Uji Dual Culture Sel Bakteri Endofitik terhadap Jamur *Rs* dan *Po*

Hasil uji *dual culture* bakteri endofitik terhadap penghambatan pertumbuhan jamur *Rs* diukur melalui zona bening yang dihasilkan dari bakteri antagonis dan jamur *Rs* (Tabel 3). Uji daya hambat bakteri terhadap jamur *Po* tidak menunjukkan adanya zona bening.

Tabel 3 menunjukkan bahwa isolat E 66 merupakan isolat terbaik karena membentuk zona bening terluas di sekitar koloni sebesar 18,1 mM. Zona bening yang terbentuk merupakan hasil metabolisme yang dihasilkan oleh bakteri untuk melindungi diri dan menghambat pertumbuhan patogen jamur (Wu *et al.*, 2009). Mekanisme penghambatan lainnya yang dapat dilakukan oleh isolat endofitik terjadi melalui kompetisi makanan, pelepasan enzim katalitik berupa kitinase yang dapat mendegradasi dinding sel jamur, protein, selulase, dan lainnya (Pliego *et al.*, 2011). Perbandingan yang diguna-

Tabel 2. Warna koloni dan bentuk sel bakteri endofitik.

Isolat endofitik	Warna koloni	Bentuk	Gram
E63	Putih	Batang	Positif
E64	Putih	Batang	Negatif
E65	Putih	Batang	Positif
E66	Putih	Batang	Positif
E68	Putih	Batang	Positif
E73	Putih	Batang	Positif
E76	Putih	Batang	Negatif
E94	Kuning	Batang	Positif
E95	Kuning	Batang	Negatif
E130	Putih	Batang	Positif

Warna koloni diamati dari masing-masing dua pengulangan cawan petri dan bentuk morfologi sel diamati dengan menggunakan mikroskop Olympus dengan perbesaran 100 x.

Tabel 3. Zona bening yang dihasilkan di sekitar bakteri endofitik.

Perlakuan	Rata-rata zona bening (mm)
Kontrol + <i>Rs</i>	0 d
E63 + <i>Rs</i>	0 d
E64 + <i>Rs</i>	13 abc
E65 + <i>Rs</i>	13,5 abc
E66 + <i>Rs</i>	18,1 a
E68 + <i>Rs</i>	7,5 bc
E73 + <i>Rs</i>	9,2 bc
E76 + <i>Rs</i>	6,5 cd
E94 + <i>Rs</i>	14,5 ab
E95 + <i>Rs</i>	13,5 abc
E130 + <i>Rs</i>	8,1 bc

Angka dalam satu lajur yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji Duncan. Pengamatan dilakukan dari tiga ulangan.

kan berupa goresan air tidak menunjukkan adanya zona bening.

Penghambatan pertumbuhan jamur *Po* diukur melalui luas koloni jamur yang terbentuk. Koloni jamur yang semakin kecil berarti isolat endofitik berhasil menghambat pertumbuhan patogen jamur tersebut (Tabel 4).

Isolat E65 merupakan isolat terbaik yang dapat menghambat jamur *Po* dengan rata-rata luas koloni jamur paling kecil dibandingkan dengan isolat lainnya, yaitu 15,8 cm². Kontrol dan isolat E63 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan bakteri yang diuji, kecuali E 63. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang diuji lebih unggul dibandingkan dengan kontrol dalam menghambat pertumbuhan jamur. Beberapa isolat endofitik dapat menghambat pertumbuhan miselia dari *Po*. Tingkat penghambatan pertumbuhan jamur *Po* dapat dilihat pada Tabel 4. Makin besar tingkat penghambatan makin baik

Tabel 4. Rata-rata luas koloni pertumbuhan dan penghambatan jamur *Po* hasil *dual culture* dengan bakteri endofitik.

Perlakuan	Rata-rata luas koloni jamur <i>Po</i> (cm ²)	Penghambatan <i>Po</i> (%)
Kontrol + <i>Po</i>	30,2 a	-
E63 + <i>Po</i>	30,2 a	-
E64 + <i>Po</i>	16,2 b	46,2
E65 + <i>Po</i>	15,8 b	47,7
E66 + <i>Po</i>	16,3 b	46,0
E68 + <i>Po</i>	19,2 b	36,3
E73 + <i>Po</i>	16,2 b	46,2
E76 + <i>Po</i>	17,4 b	42,5
E94 + <i>Po</i>	16,4 b	46,1
E95 + <i>Po</i>	15,9 b	47,4
E130 + <i>Po</i>	16,4 b	45,6

Angka dalam satu lajur yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji Duncan. Pengamatan dilakukan dari tiga ulangan.

bakteri tersebut dalam menghambat pertumbuhan jamur *Po*. Tingkat penghambatan pertumbuhan jamur *Po* terbesar terlihat pada isolat E65, yaitu 47,7%.

Uji *Dual Culture* Filtrat Bakteri Endofitik terhadap Jamur *Rs* dan *Po*

Hasil pengujian *dual culture* filtrat bakteri endofitik terhadap penghambatan pertumbuhan jamur *Rs* dan *Po* diukur melalui luas koloni jamur yang terbentuk. Semua isolat dapat menghambat pertumbuhan jamur *Rs* dan *Po*. Isolat E95 merupakan isolat terbaik dalam menghambat pertumbuhan koloni *Rs* dengan rata-rata luas koloni jamur 0,4 cm² (Tabel 5).

Penghambatan yang terjadi merupakan kinerja metabolisme yang dihasilkan oleh bakteri. Laju penghambatan terus meningkat jika komponen bioaktif yang ada pada supernatan semakin banyak. Hal ini dapat disebabkan oleh zat yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan jamur yang berada di luar sel, sehingga setelah sel disentrifugasi, zat tersebut keluar dari dalam sel dan berada pada bagian filtrat suspensi bakteri (Nalisha *et al.*, 2006). Isolat E95 dan E130 merupakan isolat terbaik dalam menghambat pertumbuhan jamur *Rs* maupun *Po* yang ditunjukkan oleh tingkat penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lain, masing-masing 99,4 dan 98,1% (Tabel 5).

Mekanisme biokontrol yang dilakukan oleh bakteri untuk memberikan perlindungan pada tanaman adalah melalui produksi *siderophores* (pengkelat besi), metabolit sekunder dengan aktivitas

antijamur, produk bioaktif antimikroba, antibiotik, dan kompetisi untuk mendapatkan nutrisi (Jimenez *et al.*, 2001; Jalgaonwala *et al.*, 2010). Contoh antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan jamur misalnya iturin dan surfaktin. Iturin terdiri atas tujuh buah residu asam amino yang bersifat hidrofilik dan ekor hidrokarbon dengan panjang 10-13 karbon yang bersifat hidrofobik. Surfaktin adalah antibiotik yang memiliki kerja sebagai suatu biosurfaktan yang dapat merusak permeabilitas membran sel dengan cara menurunkan tegangan permukaan. Surfaktin merupakan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan jamur patogen (Yuliar, 2008). *Pseudomonas* sp. memproduksi metabolit sekunder berupa antibiotik atau *siderophores* (pengkelat besi) yang merupakan mekanisme antijamur paling penting bagi *Pseudomonas*. Antibiotik yang disintesis oleh *Pseudomonas*, adalah 2,4-diasetilphloroglucinol (Phl), pyoluteorin (Plt), pyrrolnitrin (Prn), dan phenazine-1-carboxylic acid (PCA) (Wu *et al.*, 2009; Hassanein *et al.*, 2009).

Uji Kitinase

Uji kitinase pada bakteri endofitik bertujuan untuk mengetahui keberadaan enzim kitinase yang dihasilkan bakteri endofitik. Enzim tersebut berperan mendegradasi dinding sel jamur yang mengandung zat kitin. Setelah penambahan *congo red* 0,1%, koloni menghasilkan zona bening yang terlihat jelas di antara media yang berwarna merah. Zona bening diukur untuk mengetahui keberadaan enzim kitinase yang dihasilkan bakteri tersebut. Di antara isolat yang diuji, E76 merupakan satu-satu-

nya isolat yang menghasilkan zona bening. Rata-rata zona bening yang dibentuk oleh isolat E76 adalah $0,9 \pm 0,1$ cm. Adanya zona bening mengindikasikan bahwa mekanisme penghambatan oleh isolat E76 diduga melalui degradasi kitin pada dinding sel jamur dengan enzim penghidrolisis kitin, yaitu kitinase. Beberapa bakteri endofitik dapat memproduksi dan melepas enzim litik untuk melawan patogen berupa kitinase, protease, selulase, hemiselulase, dan DNA yang dapat menekan aktivitas patogen secara langsung. Mekanisme yang dilakukan dapat melalui kitinase dengan mendegradasi dinding sel patogen jamur yang banyak mengandung kitin atau protease (Huang *et al.*, 2005). Beberapa produk enzim litik dapat menekan penyakit secara tidak langsung, seperti oligosakarida yang dihasilkan dari dinding sel jamur yang dapat ber-

peran sebagai penginduksi ketahanan tanaman (Pliego *et al.*, 2011).

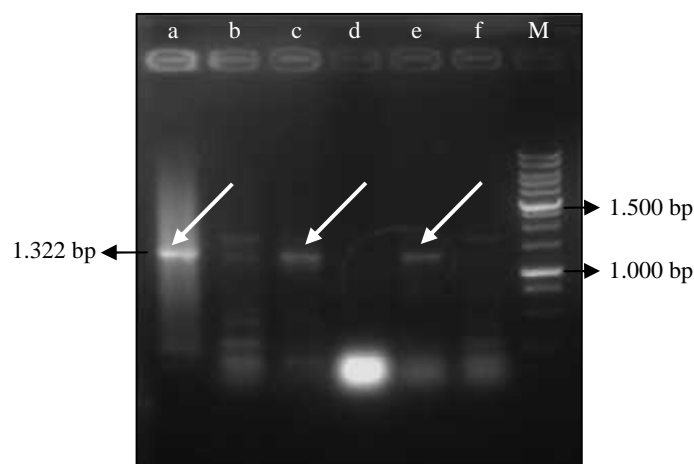
Amplifikasi 16s rDNA

Identifikasi bakteri berdasarkan 16s rDNA potensial digunakan sebagai alternatif jika karakterisasi secara fenotipik sulit dilakukan (Drancourt, 2000; Macrae, 2000). Penggunaan 16s rDNA dapat menyediakan identifikasi genus dan spesies bakteri yang tidak dapat dikenali secara biokimia (Janda dan Abbott, 2007). Amplifikasi gen 16s rDNA hanya dilakukan pada beberapa isolat yang terbukti lebih unggul dibandingkan dengan isolat lainnya melalui pengujian *dual culture* yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu isolat E64, E66, E76, E94, dan E95 (Gambar 1). Sepasang primer spesifik untuk

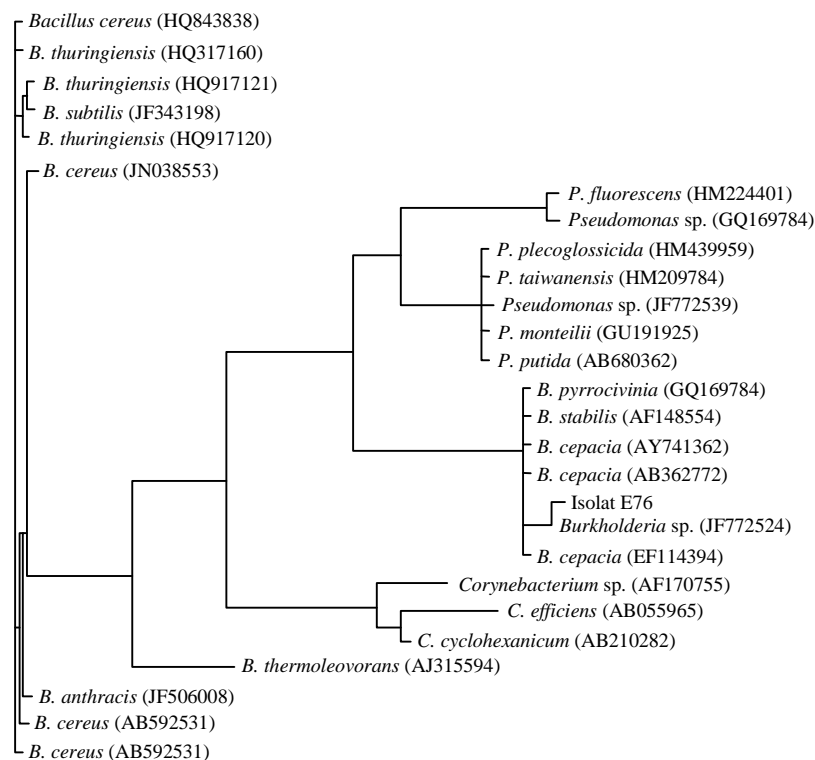
Tabel 5. Rata-rata luas koloni dan tingkat penghambatan pertumbuhan jamur *Rs* dan *Po* oleh filtrat bakteri endofitik.

Perlakuan	Rata-rata luas koloni jamur <i>Rs</i> (cm ²)	Penghambatan <i>Rs</i> (%)	Rata-rata luas koloni jamur <i>Po</i> (cm ²)	Penghambatan <i>Po</i> (%)
Kontrol + <i>Rs/Po</i>	63,6 a	-	36,9 a	-
E63 + <i>Rs/Po</i>	63,6 a	-	35,8 a	3,0
E64 + <i>Rs/Po</i>	1,0 c	98,3	0,9 b	97,4
E65 + <i>Rs/Po</i>	0,5 c	99,2	0,8 b	97,7
E66 + <i>Rs/Po</i>	1,3 c	98,0	0,7 b	98,1
E68 + <i>Rs/Po</i>	1,2 c	98,1	4,1 b	88,8
E73 + <i>Rs/Po</i>	12,6 c	80,2	1,6 b	95,5
E76 + <i>Rs/Po</i>	42,6 b	32,9	32,4 a	12,2
E94 + <i>Rs/Po</i>	1,4 c	97,8	0,7 b	97,9
E95 + <i>Rs/Po</i>	0,4 c	99,4	0,7 b	98,1
E130 + <i>Rs/Po</i>	3,5 c	94,4	0,7 b	98,1

Angka dalam satu lajur yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji Duncan. Pengamatan dilakukan dari tiga ulangan.



Gambar 1. Hasil amplifikasi 16s rDNA terhadap beberapa isolat endofitik. A = E76 koloni, b = E64 DNA, c = E66 DNA, d = E76 DNA, e = E94 DNA, f = E95 DNA, M = marker.



Gambar 2. Pohon filogenetik isolat E76 dengan kelompok kerabatnya.

gen 16s rRNA digunakan untuk mengamplifikasi pada daerah di sekitar 1.000-1.500 bp.

Gen 16s rDNA pada isolat E76, E64, E66, dan E94 berhasil teramplifikasi pada daerah sekitar 1.300 bp. Hasil amplifikasi gen 16s rDNA pada isolat E76 (koloni) dan isolat E64 menunjukkan adanya pita DNA non target yang ikut teramplifikasi, diduga karena ada bagian basa di tempat non target yang memiliki kemiripan dengan primer. Hasil pengurutan basa gen 16s rDNA pada isolat E76 (koloni) dengan panjang nukleotida 1.322 bp menunjukkan isolat tersebut memiliki kesamaan basa 99% dengan *Burkholderia* sp. Analisis fenetik sekuen gen 16s rDNA berdasarkan pustaka gen 16s rDNA menunjukkan isolat E76 satu kelompok monofiletik dengan genus *Burkholderia*. Hasil *alignment* menunjukkan isolat E76 dapat diidentifikasi sebagai *Burkholderia* sp. (Gambar 2).

KESIMPULAN

Seleksi dan karakterisasi isolat endofitik secara *in vitro* dalam goresan sel bakteri utuh secara langsung maupun bentuk filtrat bakteri mampu

menghambat pertumbuhan koloni jamur patogen *Rs* dan *Po*.

Isolat E76 menghasilkan zona bening dan indeks kitinolitik tertinggi. Secara morfologi, isolat E76 termasuk bakteri Gram negatif dengan morfologi sel berbentuk batang dan memiliki kemiripan basa sebesar 99% dengan *Burkholderia* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, P.C., C.N. Mortensen, and S.B. Mathur. 1989. Seed borne diseases and seed health testing of rice. Tech. Bull. No. 3. Danish Government Institut of Seed Pathology for Developing Countries. CAB Int. Mycol. Inst., Copenhagen. 106 p.
- Ardakani, S.S., A. Haydari, N. Khorasani, and R. Arjmandi. 2010. Development of new bioformulations of *Pseudomonas fluorescens* and evaluation of these products against damping-off of cotton seedlings. J. Plant Pathol. 92:83-88.
- Amal, A.A, K.A. Abd-Elsalam, M.R. Omar, and A.A. Aly. 2005. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* and use of M13 microsatellite-primed PCR to evaluate the antagonist genetic variation. J. Plant Dis. Protec. 112(6):550-561.

- Bandara, W.M.M.S., G. Sebeviratne, and S.A. Kulasooriya. 2006. Interactions among endophytic bacteria and jamur: Effects and potentials. *J. Bioscience* 31:645-650.
- Dorrance, A.E. and D.R. Mills. 2010. *Rhizoctonia* damping-off and stem rot of soybeans. Retrieved from Ohio State University, Agricultural and Natural Resources. <http://ohioline.osu.edu/ac-fact/pdf/0025.pdf>. [diakses 25 Juli 2011].
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, J.P. Gayral, and D. Raoult. 2000. 16s ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clinical Microbiol.* 38:3623-3630.
- Edwards, J.E., N.R. McEwan, A.J. Travis, and R.J. Wallace. 2004. 16s rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:263-281.
- Gouramanis, G.D. 1999. Biological and chemical control of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) in Northern Greece. *Cahiers Options Mediterraneennes* 15:61-68.
- Hassanein, W.A., N.M. Awany, A.A. El-Moughith, and S.H. El-Dien. 2009. The antagonistic activities of some metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Sci. Res.* 5:404-414.
- Huang, C.J., T.K. Wang, S.C. Chung, and C.J. Chen. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent *B. cereus* 28-29. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38:82-88.
- Jalgaonwala, R.E., B.V. Mohite, and R.T. Mahajan. 2010. Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to North Maharashtra Region India. *J. Pharmaceutical Biomedical Research* 1:136-141.
- Janda, J.M. and S.L. Abbott. 2007. 16s rRNA Gene Sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clinical Microbiol.* 45:2761-2764.
- Jimenez, M.B., S.A. Flores, M.V. del Valle, A. Perez, A. Zepeda, and E. Zenteno. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 33:167-172.
- Kazempour, M.N. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *J. Plant Pathol.* 3:88-96.
- Kobayashi, D.Y. and J.D. Palumbo. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. p. 199-233. *In* C.W. Bacon and J.F. White (eds.) *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Macrae, A. 2000. The use of 16s rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian J. Microbiol.* 31:77-82.
- Marlina. 2008. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan metode *biolog* dan deteksi gen *ToxRnya* secara PCR. *J. Sains Teknologi Farmasi* 13:11-17.
- Montealegre, J.R., R. Reyes, L.M. Perez, R. Herrera, P. Silva, and X. Besoain. 2003. Selection of bio-antagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic J. Biotechnol.* 6:116-127.
- Nalisha, I., M. Muskhazli, and T.N. Faizan. 2006. Production of bioactive compound by *B. subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. *Malaysian J. Microbiol.* 2:19-23.
- Pliego, C., C. Ramos, A. de Vicente, and F.M. Cazorla. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340:505-520.
- Sehajpal, A., S. Arora, and P. Kaur. 2009. Evaluation of plant extract against *Rhizoctonia solani* Causing sheath blight of rice. *J. Plant Protec. Sci.* 1:25-30.
- Spindler, K.D. 1997. Chitinase and Chitosanase Assays. p. 229-235. *In* R.A.A. Muzarelli and M.G. Peter (eds.) *Chitin Handbook*. Alda Tecnografica. Grottammare, Italy.
- Sun, L., F. Qiu, X. Zhang, X. Dai, X. Dong, and W. Song. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16s rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology* 55:415-424.
- Udomsilp, J., A. Piyo, P. Khang-Khun, and P. Thobunluepop. 2009. Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, p. 24-30.
- Van, L., N.T.P. Lan, P.V. Du, and T.W. Mew. 2001. Current status and future prospects in biological control of rice sheath blight in Mekong Delta. *Omonrice* 9:79-86.
- Wu, M., X. Zhang, H. Zhang, Y. Zhang, X. Li, Q. Zhou, and C. Zhang. 2009. Soil *Pseudomonas* community structure and its antagonism towards *Rhizoctonia solani* under the stress of acetochlor. *Bull. Environ. Contamination Toxicology* 83:313-317.
- Yan, L.J., X.G. Lin, L. Bin, L.Y. Chan, Z.L. Han, W. Xiao, and L. Bo. 2005. Gram positive bacteria associated with rice in China and their antagonists against the pathogens of sheath blight and bakanae disease in rice. *Rice Sci.* 12:213-218.
- Yuliar. 2008. Skrining bioantagonistik bakteri untuk agen biokontrol *Rhizoctonia solani* dan kemampuannya dalam menghasilkan surfaktin. *Biodiversitas* 9:83-86.
- Zinniel, D.K., P. Lambrecht, B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmariski, P. Higley, C.A. Ishimaru, A. Arunakumari, R.G. Barletta, and A.K. Vidaven. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2198-2208.