

EKSPLORASI DAN UJI SENYAWA BIOAKTIF BAKTERI AGENSIA HAYATI UNTUK PENGENDALIAN PENYAKIT KRESEK PADA PADI

Sri Kurniawati¹, Kikin Hamzah Mutaqin², & Giyanto²

¹BPTP Banten, Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian
Jl. Raya Ciptayasa Km 01 Ciruas, Serang-Banten

²Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Insitut Pertanian Bogor
Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
E-mail: giyanto2@yahoo.com

ABSTRACT

Exploration of bacterial biocontrol agent and its potential bioactive compound to control rice bacterial leaf blight. The research aims were to obtain bacterial isolates which were potential as biological control agent of *X. oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of rice bacterial blight and to assess the effectiveness of their bioactive compounds, and to identify of the potential isolates. The research steps included bacterial isolation, screening based on antibiosis activity and pathogenicity test, characterization based on chitinolytic enzyme production, siderophores, and phosphate dissolution test, effectiveness test of bioactive compounds and molecular identification of potential isolates. Out of 156 bacterial isolates from rice crop tested, 11 isolates showed to be non plant pathogenic and to have activity as biological agents against *X. oryzae* pv. *oryzae* pathotype III, IV and VIII. Further characterization of 11 isolates resulted in 2 isolates that showed ability to produce chitinase (isolates T5-1118 and R7-1018), phosphatase (isolates T5-1105 and T6-1109), and siderophores (isolates T5-1118 and T6-1109). The test of bioactive compound effectiveness of 4 isolates to the growth of *X. oryzae* pv. *oryzae* showed that T5-1118, T5-1105, T6-1109 and R7-1018 have ability to inhibit *X. oryzae* pv. *oryzae* at 48 hours after inoculation of 66,61%, 62,4%, 23,97% and 12,40%, respectively. Identification of 4 bacterial biocontrol isolates with partial sequencing of 16S rRNA gene showed that those bacteria are close to *Bacillus nealsonii* strain F22 (R7-1018), *Chromobacterium* sp. MWU328 (T5-1118), *Streptomyces* sp. Antag 1 (T5-1105) and *Kitasatospora nipponensis* strains H2-4 (T6-1109).

Key words: *Bacillus*, characterization, *Chromobacterium*, *Kitasatospora*, *Streptomyces*

ABSTRAK

Eksplorasi dan uji senyawa bioaktif bakteri agensia hayati untuk pengendalian penyakit kresek pada padi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri yang berpotensi sebagai agensia hayati untuk menghambat pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae*, menguji keefektifan senyawa bioaktif yang dihasilkannya dan mengidentifikasi isolat bakteri yang teruji berpotensi sebagai agensia hayati tersebut. Metode penelitian meliputi isolasi, penapisan melalui uji antibiosis dan patogenisitas, karakterisasi dengan uji produksi enzim kitinolitik, siderofor dan pelarutan fosfat. Isolat yang terpilih diuji potensi senyawa bioaktifnya dan identifikasi secara molekuler melalui sekuensing gen 16S rRNA. Sebanyak 156 isolat bakteri telah diperoleh dari pertanaman padi, 11 isolat bakteri diantaranya menunjukkan potensi sebagai agensia hayati yang ditunjukkan dengan kemampuan menghambat *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VIII dan tidak bersifat patogenik terhadap tanaman. Karakterisasi terhadap 11 isolat tersebut menghasilkan 4 isolat yang memiliki keunggulan berupa kemampuan aktivitas kitinolitik (T5-1118 dan R7-1018), melarutkan fosfat (T5-1105 dan T6-1109), dan produksi siderofor (T5-1118 dan T6-1109). Pengujian potensi senyawa bioaktif dari keempat isolat secara *in vitro* menunjukkan bahwa isolat T5-1118, T5-1105, T6-1109 dan R7-1018 dapat menghambat pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* pada 48 jam setelah inokulasi masing-masing sebesar 66,61; 62,4; 23,97 dan 12,40%. Identifikasi berdasarkan sekuensing parsial gen pengkode 16S rRNA menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut adalah *Bacillus nealsonii* strain F22 (R7-1018), *Chromobacterium* sp. MWU328 (T5-1118), *Streptomyces* sp. Antag1 (T5-1105) dan *Kitasatospora nipponensis* strain H2-4 (T6-1109).

Kata kunci: *Bacillus*, *Chromobacterium*, karakterisasi, *Kitasatospora*, *Streptomyces*

PENDAHULUAN

Pemerintah Republik Indonesia menargetkan produksi padi tahun 2013 sebesar 72,06 juta ton gabah

kering giling (GKG) dan surplus beras 10 juta ton pada tahun 2015. Namun, produksi padi yang dicapai tahun 2013 adalah 71,23 juta ton GKG dengan realisasi luas panen 13,84 juta ha (BPS, 2014). Fakta tersebut

menunjukkan terdapat kesenjangan antara target dan realisasi produksi padi. Salah satu faktor pembatas dalam produksi padi di Indonesia adalah adanya penyakit kresek atau hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Penyakit ini dapat menyebabkan kehilangan hasil sebesar 35,8% (Suparyono & Sudir, 1992). Bakteri patogen ini dilaporkan memiliki beberapa patotipe dan yang dominan di Indonesia adalah patotipe III, IV dan VIII (Suparyono et al., 2004).

Sejauh ini pengendalian penyakit kresek adalah menggunakan varietas unggul baru (VUB) tahan kresek seperti Conde dan Angke. Namun demikian, penggunaan benih VUB ini memiliki beberapa kelemahan diantaranya benih sulit diperoleh di pasaran dan kurang diminati oleh petani maupun konsumen. Selain itu, kelemahan lainnya dalam penggunaan varietas tahan adalah ketahanan terhadap suatu patotipe *X. oryzae* pv. *oryzae* mudah dipatahkan jika ditanam dalam pola tanam monokultur yang luas dan dalam waktu yang lama. Teknik pengendalian lainnya adalah dengan penggunaan bakterisida sintetik yang memiliki keefektifan yang tinggi dalam mengendalikan bakteri patogen ini, namun penggunaan bakterisida secara terus menerus dapat memicu terjadinya resistensi patogen, matinya organisme bukan sasaran, pencemaran lingkungan, residu pada produk yang membahayakan bagi kesehatan manusia.

Penggunaan agensia hayati sebagai komponen pengendalian dalam mengendalikan *X. oryzae* pv. *oryzae* memiliki prospek yang baik karena diyakini bersifat efektif, kompatibel atau sinergi dengan teknik pengendalian lain dan aman bagi lingkungan. Penelitian-penelitian tentang pengembangan agensia hayati terhadap penyakit kresek pada padi telah banyak dilaporkan. Velusamy et al. (2006) berhasil mengisolasi *Pseudomonas fluorescens* yang menghasilkan senyawa anti mikroba yang dikenal sebagai 2,4-diacetyl phloroglucinol (DAPG). Selanjutnya, Hoa et al. (2012) melakukan skrining agensia antagonis dan memperoleh beberapa strain *Actinomycetes* termasuk *Streptomyces virginiae* yang mampu menghambat 10 patotipe *X. oryzae* pv. *oryzae*. Hastuti et al. (2012) melaporkan bahwa *Streptomyces* spp. dapat menurunkan keparahan penyakit kresek dalam percobaan di rumah kaca maupun di lapangan yang setara dengan perlakuan bakterisida. Demikian pula penggunaan bakteri agensia hayati *Pseudomonas diminuta*, *P. aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* dapat mengendalikan bakteri penyebab penyakit kresek ini dan meningkatkan pertumbuhan tanaman padi (Agustiansyah et al., 2013).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri agensia hayati dari pertanaman padi yang

berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri penyebab penyakit kresek *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VIII, menguji keefektifan senyawa bioaktif yang dihasilkannya dan mengidentifikasi isolat bakteri penghasil senyawa bioaktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen tersebut.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteri Patogen Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor dari bulan April sampai dengan Desember 2013.

Isolasi Bakteri Agensia Hayati dari Tanah, Rizosfer dan Bakteri Endofit. Contoh tanaman adalah tanaman padi sehat yang diambil di antara tanaman yang terserang penyakit kresek. Lokasi pengambilan contoh dari lahan sawah tadah hujan dilakukan di Desa Widodomartani, Kecamatan Ngeplak dan Desa Harjobinangun, Kecamatan Tratas, Kabupaten Sleman, Yogyakarta (Contoh 1-6), contoh dari lahan sawah irigasi di Desa Gempol Sari, Kecamatan Patok Beusi, Kabupaten Subang, Jawa Barat (Contoh 7), dan contoh dari lahan rawa tipe A di Desa Karang Indah, Kecamatan Mandastana, Kabupaten Barito Kuala, Kalimantan Selatan pada agroekosistem lahan rawa tipe A (Contoh 8).

Isolasi Bakteri dari Tanah dan Rizosfer Pertanaman Padi. Bakteri kandidat agensia hayati diisolasi dari rizosfer tanaman padi dengan metode pengenceran bertingkat dan pencawanan (*serial dilution and plating*). Sebanyak 10 g tanah dimasukkan ke dalam 90 ml larutan fisiologis (0,85% NaCl) dan dibuat seri pengenceran 10^0 – 10^{-6} . Suspensi tersebut dihomogenisasikan dalam *rotary shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 30 menit. Suspensi diambil sebanyak 0,1 ml dan disebar pada medium *tryptic soy agar/TSA* (*pancreatic digest of casein* 17 g, NaCl 5 g, *papaic digest of soybean meal* 3 g, K_2HPO_4 2,5 g, glukosa 2,5 g dan agar 15 g dalam 1000 ml akuades) 100% dan 5%, King's B (*pepton protease* 20 g, K_2HPO_4 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, agar 15 g dan gliserol 15 ml dalam 1000 ml akuades), *water-yeast extract-agar/WYE* (*yeast extract* 0,25 g, K_2HPO_4 0,5 g dan agar 18 g, dalam 1000 ml akuades), *casamino acid-yeast extract-glucose-agar/YCED* (*yeast extract* 0,3 g, *casamino acid* 0,3 g, *D-glucose* 0,3 g, K_2HPO_4 2 g, dan agar 18 g dalam 1000 ml akuades) dan *nutrient agar/NA* (*Beef extract* 3 g, *pepton* 5 g dan agar 15 g dalam 1000 ml

akuades), selanjutnya diinkubasikan selama 2–14 hari pada suhu kamar.

Isolasi Bakteri Endofit Tanaman Padi. Isolasi bakteri endofit pada bagian akar, batang dan daun padi mengikuti metode Hallmann *et al.* (1997) dan Munif *et al.* (2012).

Penyediaan Isolat Bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae*. Isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VIII diperoleh dari koleksi Balai Besar Penelitian Tanaman Padi di Sukamandi, Subang, Jawa Barat. Isolat diremajakan dalam media Wakimoto Agar (WA) (bacto pepton 7 g, sukrosa 17 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 18 g, kaldu dari kentang 300 g dalam 1000 ml akuades) sebelum digunakan untuk pengujian.

Uji Kemampuan Antibiosis. Seleksi bakteri kandidat agensia hayati melalui pengujian antibiosis terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VIII. Pengujian yang digunakan adalah dengan menggunakan metode *double layer* (Lisboa *et al.*, 2006) dan *cross cross-streak* (Madigan *et al.*, 1997) yang telah dimodifikasi.

Metode Double Layer. Isolat bakteri dibiakkan dalam media NB (*Nutrient Broth*) selama 48 jam di atas inkubator bergoyang (100 rpm). Selanjutnya, suspensi bakteri dengan kerapatan 10^6 – 10^9 cfu/ml ($\text{OD}_{600} = 0,16$ - $1,2$) digunakan dalam pengujian. Bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* dibiakkan pada media Wakimoto *Broth* 48 jam di atas inkubator bergoyang (100 rpm). Sebanyak 100 μl suspensi *X. oryzae* pv. *oryzae* disebarkan pada permukaan media WA secara merata menggunakan *glass beads* dan dikeringanginkan. Selanjutnya, 5 potongan kertas steril dengan diameter 5 mm diletakan secara teratur pada permukaan media. Sebanyak 4 potongan kertas saring masing-masing ditetesi 5 μl suspensi isolat bakteri yang berbeda dan 1 potongan kertas saring ditetesi 5 μl media biakan yang tidak mengandung bakteri sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan terhadap lebar zone bening di sekitar kertas saring yang merupakan reaksi penghambatan dari bakteri agensia hayati terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae*.

Metode Cross-Streak. Metode ini digunakan untuk pengujian kelompok bakteri aktinomiset pada media WA. Isolat aktinomiset digores pada satu sisi cawan seluas sepertiga cawan. Aktinomiset diinkubasi selama 5 hari untuk memberi kesempatan tumbuh dan menghasilkan senyawa bioaktif yang akan berdifusi ke media agar. Setelah 5 hari, bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* digoreskan pada sisi cawan yang kosong sepanjang 4,5 cm dengan arah tegak lurus terhadap goresan isolat

aktinomiset dan diinkubasi hingga tumbuh. Isolat aktinomiset yang berpotensi antagonis akan ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan di mana *X. oryzae* pv. *oryzae* yang digores tidak tumbuh.

Karakterisasi Bakteri Agens Hayati. Karakterisasi bakteri agens hayati terdiri dari pengujian reaksi hipersensitif, aktivitas kitinolitik, pelarutan posfat dan produksi siderofor.

Pengujian Reaksi Hipersensitif. Bakteri kandidat agensia hayati yang menghasilkan senyawa bioaktif, diuji potensi patogenitasnya dengan menggunakan uji hipersensitif pada tembakau varietas White Burley. Bakteri yang telah dikulturkan dalam media NB selama 24 jam di atas inkubator bergoyang dengan kecepatan 100 rpm pada kerapatan 10^8 – 10^9 cfu/ml ($\text{OD}_{600} = 0,16$ - $1,2$) kemudian diinfiltrasikan menggunakan jarum suntik (*syringe*) ke dalam jaringan daun tembakau pada permukaan bawah daun. Respon tanaman berupa gejala hipersensitif diamati pada 1–2 hari setelah inokulasi.

Uji Aktivitas Kitinolitik. Pengujian dilakukan pada media agar koloidal kitin 0,2% (Lingappa & Lockwood, 1962). Pengujian aktivitas kitinolitik dilakukan dengan meneteskan suspensi bakteri pada kertas saring sebanyak 5 μl di atas media koloidal kitin dan diinkubasikan selama 4–7 hari pada suhu ruangan. Aktivitas kitinolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar biakan bakteri.

Uji Produksi Siderofor. Produksi siderofor dari bakteri agensia hayati dideteksi menggunakan media *Chroma Azurol Sulfonate* (CAS) agar (Gross, 1990). Suspensi bakteri sebanyak 5 μl ditetaskan pada kertas saring di atas media CAS dan diinkubasikan selama 4-7 hari pada suhu ruangan. Produksi siderofor diindikasikan dengan adanya warna orange di sekeliling koloni bakteri.

Uji Pelarutan Fosfat. Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat diuji dengan menggunakan media *Pikovskaya Agar* (Rao & Sinha, 1962). Suspensi bakteri sebanyak 5 μl ditetaskan pada kertas saring di atas media *Pikovskaya* dan diinkubasikan selama 4-7 hari pada suhu ruangan. Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat diindikasikan dengan adanya zona bening di sekeliling koloni bakteri.

Uji Potensi Senyawa Bioaktif untuk Menekan Pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae*. Potensi senyawa bioaktif bakteri agensia hayati dilakukan dengan menggunakan metode peracunan media (*poisoned food technique*) berdasarkan metode Singh *et al.* (2005) yang dimodifikasi. Bakteri agensia hayati dibiakkan pada media NB, selama 5 hari untuk kelompok bakteri aktinomiset dan 2 hari untuk kelompok

bakteri lainnya pada inkubator bergoyang 100 rpm. Selanjutnya bahan bioaktif yang dihasilkan bakteri tersebut dipisahkan menggunakan filter (Corning NY 14831 Germany) ukuran 0,45 μ l. Media LB (Tryptone 10 g, NaCl 5 g, yeast extract 5 g, akuades 1000 ml) sebanyak 90 ml disiapkan untuk masing-masing perlakuan isolat bakteri dan dicampur dengan senyawa bioaktif sebanyak 10 ml. Suspensi *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe IV sebanyak 100 μ l yang telah dibiakkan pada media Wakimoto cair selama 24 jam (OD_{600} 0,610) diinokulasikan pada media yang mengandung senyawa bioaktif selanjutnya diinkubasikan pada inkubator bergoyang dan diamati secara berkala nilai Absorbance (OD_{600}) sampai dengan 48 jam. Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf nyata 5%, menggunakan piranti lunak *Statistical Analysis System* (SAS) versi 9.1.3 untuk Windows.

Identifikasi Isolat Bakteri dengan Sekuensing Parsial Gen Pengkode 16S rRNA.

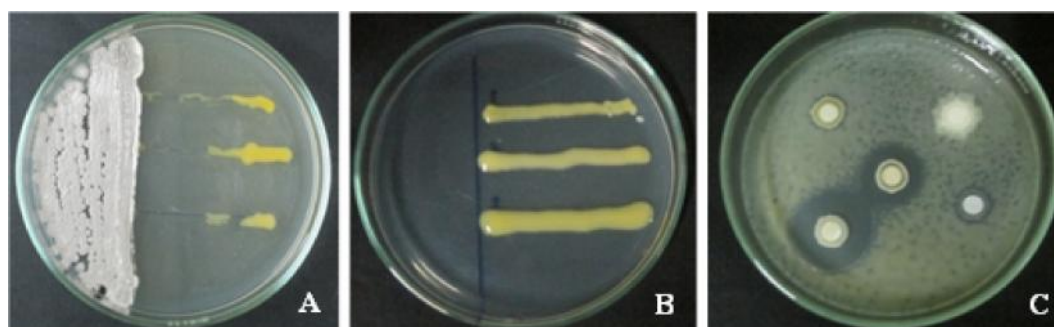
Identifikasi secara molekuler dilakukan pada isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan memiliki karakteristik unggul (kemampuan kitinolitik, melarutkan fosfat atau memproduksi siderofor). Persiapan yang dilakukan sebelum melakukan proses sekuensing, terlebih dahulu dilakukan ekstraksi DNA yang mengacu pada protokol kit ekstraksi DNA (Gene JET Genomic DNA Purification Kit # K0722), selanjutnya amplifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dilanjutkan dengan sekuensing. Data sekuen gen 16S-rRNA yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam program BLASTN untuk dianalisis tingkat homologi atau kemiripannya dengan sekuen gen bakteri lain yang ada pada data base.

Amplifikasi DNA kromosom bakteri dilakukan dengan menggunakan sepasang primer general untuk

kelompok prokariotik (bakteri), yaitu 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492R (5'-GGT TAC CTT ACG ACT T-3') (Lane, 1991). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 50 μ l (Dream Taq GreenPCR Master Mix 2X1 (Fermentas) 25 μ l, Primer 27 F 20 pmol, Primer 1492 20 pmol, ddH₂O 17 μ l, template 4-6 μ l konsentrasi DNA 0,45-21,44 ng/ μ l). Proses PCR (menggunakan mesin Gene Amp PCR System 9700) terdiri dari 35 siklus dengan pemanasan awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, kemudian annealing pada suhu 55 °C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. DNA hasil PCR kemudian dielektroforesis gel agarose 1% dalam 2X TAE buffer, pada 75 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi pada *transiluminator ultraviolet* untuk mengamati pita DNA yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Kandidat Agensia Hayati. Hasil isolasi bakteri dari bagian tanah, rizosfer dan endofit akar, batang dan daun padi pada penelitian ini diperoleh 1145 isolat. Dari sejumlah isolat tersebut dipilih 156 isolat yang memiliki karakteristik koloni bakteri yang menunjukkan kelompok bakteri yang berpotensi sebagai agensia hayati seperti aktinomiset, *Pseudomonas* kelompok *fluorescens*, *Bacillus* dan *Chromobacter*. Selanjutnya, pengujian aktivitas antibiosis dilakukan pada 156 isolat bakteri tersebut terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VIII. Hasil pengujian antibiosis ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening antara bakteri agensia hayati dengan *X. oryzae* pv. *oryzae* (Gambar 1) dan terdapat keragaman kemampuan dari masing-masing bakteri dalam membentuk zona bening (Tabel 1). Pengujian lebih lanjut diperoleh 11 isolat bakteri yang dapat menekan *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV



Gambar 1. Uji antibiosis dengan menggunakan metode *cross-streak*. (A) isolat T5-1105, (B) kontrol, (C) uji antibiosis dengan metode *double layer*

dan VIII dan tidak memiliki potensi sebagai patogen tumbuhan (Tabel 1).

Uji Kemampuan Antibiosis. Isolasi agensia hayati pada pertanaman padi telah banyak dilakukan, diantaranya adalah isolasi bakteri endofit dari padi gogo yang memiliki potensi antibiosis terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Pyricularia grisea* dan dapat memacu pertumbuhan tanaman padi (Munif *et al.*, 2012). Selanjutnya, Santosa *et al.* (2003), berhasil mengisolasi bakteri yang berasal dari filosfer padi IR64 yang memiliki potensi sebagai agensia pemacu pertumbuhan. Adapun isolasi agensia hayati dari kelompok cendawan endofit telah dilakukan oleh Suada *et al.* (2012) yang dapat menghambat pertumbuhan *P. oryzae*.

Patogenesitas. Pengujian reaksi hipersensitif (*hypersensitive response/HR*) pada tanaman tembakau dilakukan untuk mengetahui apakah suatu isolat bakteri bersifat patogenik atau tidak. Jika suatu isolat diinfiltrasikan pada daun tembakau dan menunjukkan gejala nekrosis dalam waktu 24 jam, maka isolat tersebut memiliki potensi patogenik. Nekrosis tidak terjadi pada bakteri yang tidak memiliki potensi patogenik. Kematian sel yang cepat di dalam dan di sekitar sel yang terinfeksi oleh patogen merupakan reaksi hipersensitif dan hal ini berasosiasi dengan respon ketahanan tanaman (Garcion *et al.*, 2007).

Karakteristik Bakteri Agensia Hayati. Karakterisasi lebih lanjut 11 isolat bakteri agensia hayati meliputi pengujian aktivitas kitinolitik, pelarutan fosfat dan produksi siderofor. Dari hasil pengujian tersebut

diperoleh empat isolat bakteri yang berpotensi memiliki salah satu atau lebih karakteristik unggulan (aktivitas kitinolitik, pelarutan fosfat dan produksi siderofor) sebagai agensia hayati (Tabel 2).

Aktivitas kitinolitik dimiliki oleh mikroba yang menghasilkan ezim kitinase. Enzim ini salah satu yang berperan penting dalam mekanisme antibiosis yaitu menghancurkan dinding sel beberapa cendawan patogen seperti *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* (Pal & Gardener, 2006) dan *Rhizoctonia solani* (Wahyudi *et al.*, 2011). Bakteri kitinolitik telah banyak diketahui berasal dari kelompok *Bacillus*, *Serratia* (Pal & Gardener, 2006), *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* dan *Chromobacterium* (Park *et al.*, 2005).

Adapun aktivitas pelarutan fosfat dan produksi siderofor merupakan mekanisme kompetisi nutrisi yang dilakukan oleh agensia hayati dengan patogen. Fosfat di dalam tanah seringkali berada dalam bentuk yang terikat dengan kalsium pada tanah basa, sedangkan pada tanah masam terikat dengan aluminium dan besi. Bakteri pelarut fosfat seperti *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Rhizobium* dapat meningkatkan ketersediaan fosfat di dalam tanah (Goldstein, 1995) bagi tanaman dan mikroba tanah lainnya. Hal ini berkaitan dengan dihasilkannya asam organik seperti *formic*, *acetic*, *propionic*, *lactic*, *glycolic*, *fumaric* dan *succinic* yang dapat meningkatkan pH tanah dan menghasilkan H⁺ dengan menggantikan Ca²⁺ kemudian melepaskan HPO₄²⁻ ke dalam tanah (Yasmin *et al.*, 2009).

Demikian pula dengan ketersediaan besi yang dapat diserap oleh organisme sangat rendah yaitu sekitar

Tabel 1. Hasil pengujian kemampuan antibiosis dan reaksi hipersensitif bakteri agensia hayati

Kode isolat	Zona hambat (mm)			Asal isolat		
	Patotipe <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>			Habitat	Kabupaten	Agroekosistem
	III	IV	VIII			
T5-1118	3	5	3	Tanah	Sleman	Sawah tadah hujan
R7-1018	3	3	2	Rhizosfer	Subang	Sawah irigasi
EA4-1130	7	4	2	Endofit akar	Sleman	Sawah tadah hujan
R7-1024	2	3	2	Rhizosfer	Subang	Sawah Irigasi
T6-1112*	30	25	34	Tanah	Sleman	Sawah tadah hujan
EA8-910	2	5	5	Endofit akar	Barito Kuala	Rawa
T6-1109*	45	40	39	Tanah	Sleman	Sawah tadah hujan
R1-1095*	14	24	28	Rhizosfer	Sleman	Sawah tadah hujan
T5-1105*	33	23	25	Tanah	Sleman	Sawah tadah hujan
EB7-1032	3	5	2	Endofit batang	Subang	Sawah irigasi
R7-1013	3	8	6	Rhizosfer	Subang	Sawah irigasi

10^{-18} M. Hal ini tidak mencukupi kebutuhan mikroba untuk mendukung pertumbuhannya yang secara umum dibutuhkan konsentrasi 10^{-6} M. Untuk bertahan, beberapa mikroba mampu menghasilkan siderofor yaitu senyawa yang dapat mengikat besi (*iron-binding ligands*) (Pal & Gardener, 2006). *Pseudomonas fluorescens* memproduksi pseudobactins yaitu molekul kompleks pengikat besi yang dapat menekan perkembangan penyakit dari kelompok cendawan *Oomycetes* (Handelsman & Stabb, 1996).

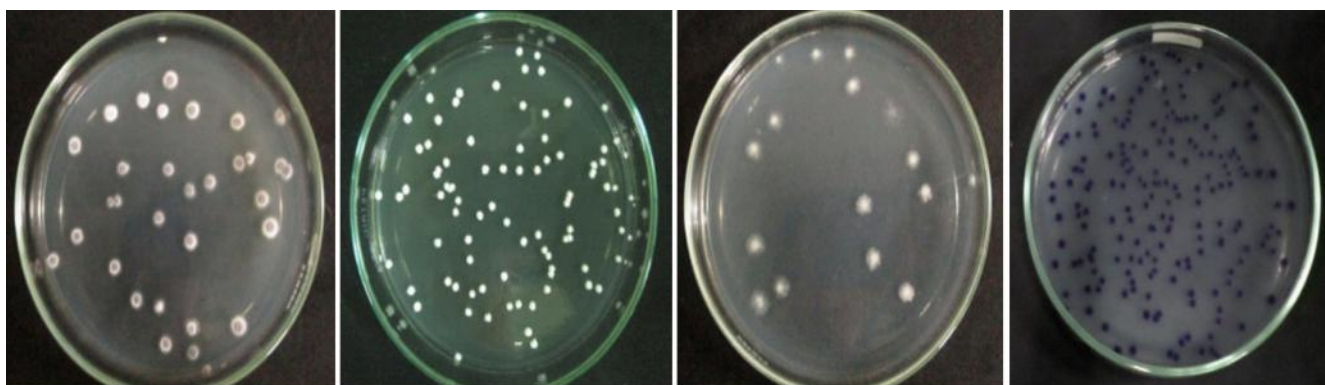
Karakteristik morfologi keempat bakteri agensia hayati memiliki keragaman warna, bentuk dan elevasi koloni bakteri (Gambar 2). Isolat T5-1105 dan T6-1109 menunjukkan karakteristik kelompok bakteri aktinomiset yaitu terdapat miselium udara (aerial) dan memiliki massa spora yang berwarna (Taechowisan *et al.*, 2003). Isolat T5-1105 memiliki spora, koloni berwarna putih, pinggirannya rata, elevasi datar, kering, tekstur lebih lembut dibandingkan dengan isolat T6-1109, dan memiliki bau khas tanah. Isolat T6-1109 menghasilkan spora, memiliki

koloni berwarna putih dan menjadi abu-abu jika umur koloni sudah tua, pinggirannya bergerigi, elevasi cembung, kering, tekstur agak keras dan memiliki bau khas tanah. Adapun karakteristik morfologi isolat T5-1118 adalah koloni berwarna ungu, pinggirannya rata, elevasi cembung, basah dan tekstur lembut. Warna ungu yang tidak berdifusi pada media agar menunjukkan karakteristik kelompok bakteri *Chromobacterium* (Leifson, 1956). Isolat R7-1018 memiliki koloni berwarna putih, pinggirannya bergerigi, elevasi datar, basah dan tekstur lembut.

Potensi Senyawa Bioaktif dalam Menekan Pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae*. Mekanisme agensia hayati dalam menghambat pertumbuhan patogen dan perkembangan penyakit dapat secara langsung melalui hiperparasit atau antibiosis dan tidak langsung melalui kompetisi dan induksi ketahanan tanaman. Mekanisme antibiosis yaitu dengan dihasilkannya senyawa bioaktif seperti antibiotik, enzim pendegradasi dan senyawa lainnya seperti ammonia, karbon dioksida

Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas kitinolitik, pelarutan fosfat dan produksi siderofor bakteri agensia hayati

Kode isolat	Zona reaksi (mm)		
	Kitinolitik	Pelarut Fosfat	Siderofor
T5-1118	5	-	2
R7-1018	3	-	-
EA4-1130	-	-	-
R7-1024	-	-	-
T6-1112	-	-	-
EA8-910	-	-	-
T6-1109	-	2	1,5
R1-1095	-	-	-
T5-1105	-	2	-
EB7-1032	-	-	-
R7-1013	-	-	-



Gambar 2. Karakteristik koloni beberapa isolat bakteri agens hayati. (A) T6-1109; (B) T5-1105; (C) R7-1018; (D) T5-1118

dan hidrogen sianida yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain (Pal & Gardener, 2006). Antibiotik dapat menghambat sintesa dinding sel, sintesa protein, sintesa DNA/RNA dan sintesa koenzim folat (Walsh, 2003). Selain itu, senyawa antibiotik dapat berperan sebagai agensia penginduksi (*elicitor*) ketahanan tanaman terhadap penyakit (Lyon, 2007).

Pengujian senyawa bioaktif dilakukan pada empat isolat yang memiliki karakteristik unggulan. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh isolat T6-1109, T5-1105, R7-1018 dan isolat T5-1118 menunjukkan potensi menghambat pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe IV secara nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95% (Gambar 3). Pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* terendah dihasilkan oleh perlakuan senyawa bioaktif asal isolat T5-1118 dengan keefektifan penekanan sebesar 66,61%. Selanjutnya diikuti berturut-turut isolat T5-1105, T6-1109 dan R7-1018 memiliki efektivitas penekanan sebesar 62,4; 23,97 dan 12,40%.

Pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* dapat dihambat oleh senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh ke empat isolat bakteri agensia hayati diduga dapat melalui berbagai mekanisme, diantaranya produksi senyawa antibiotik. Antibiotik kasugamycin yang dihasilkan oleh *Streptomyces kasugaensis* bersifat bakterisida dan fungisida. Antibiotik ini berperan sebagai penghambat (*inhibitor*) dalam sintesa protein pada mikroorganisme. Senyawa antibiotik ini telah banyak digunakan untuk mengendalikan penyakit blast pada padi dan beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen kelompok *Pseudomonas* (Doubou et al., 2001). Antibiotik lainnya yang dihasilkan oleh aktinomiset adalah *vancomycin*, *teicoplanin*, *nocardicin*, dan *thienamycin* dapat menghambat sintesa dinding sel (*peptidoglycan*), *erythromycin*, *kanamycin* dan *oleandomycin* dapat mengikat ribosom dan rifamycin dapat menghambat sintesa RNA (Walsh, 2003).

Mekanisme senyawa bioaktif dalam menghambat pertumbuhan patogen lainnya adalah produksi enzim pendegradasi senyawa polimerik seperti protein, kitin, selulosa, hemiselulosa dan DNA. Senyawa volatil yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba adalah hidrogen sianida (HCN) dan amonia. HCN dapat menghambat proses oksidasi *cytochrome* dan sangat toksik terhadap mikroorganisme yang bersifat aerob. Salah satu penghasil HCN adalah *Pseudomonas fluorescens* yang dapat menghambat perkembangan penyakit *black root* pada tembakau. Adapun amonia adalah senyawa yang bersifat volatil, salah satunya dihasilkan oleh *Enterobacter cloacae* dapat menekan perkembangan penyakit rebah kecambah pada kapas

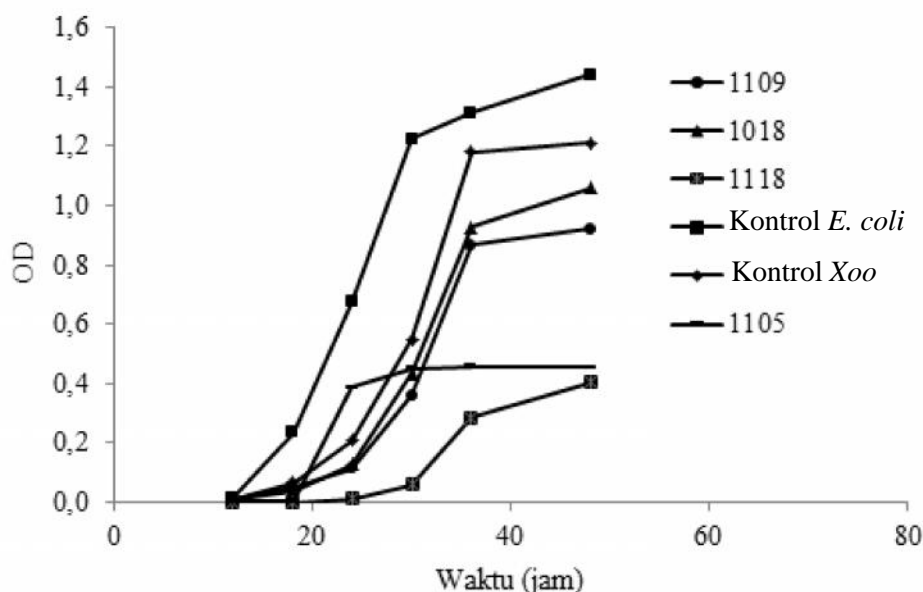
yang disebabkan oleh *Pythium ultimum* (Pal & Gardener, 2006).

Identifikasi Isolat Bakteri dengan Sekuensing Parsial Gen Pengkode 16S rRNA. Keempat isolat bakteri yang menunjukkan potensi menghambat pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* berdasarkan uji senyawa bioaktif selanjutnya diidentifikasi secara genotifik untuk memastikan identitas bakteri. Informasi ini diperlukan untuk pengembangan lebih lanjut dari bakteri agensia hayati tersebut. Hasil PCR DNA gen pengkode 16S rRNA keempat isolat selanjutnya dianalisis dengan sekuensing secara parsial. Hasil analisis sekuen menggunakan program BLASTN di pusat data Gen Bank menunjukkan isolat T5-1105 dan T6-1109 dari kelompok bakteri Aktinomiset, isolat T5-1118 adalah *Chromobacterium* dan isolat R7-1018 adalah *Bacillus* (Tabel 3).

Sekuensing 16S rRNA merupakan teknik yang sangat baik dan paling umum digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan membandingkan seberapa besar persamaan urutan nukleotidanya. Hal ini dikarenakan pada beberapa bagian 16 S rRNA merupakan gen yang sangat konservatif. Oleh karenanya, penggunaan pasangan primer pada PCR dapat mengenali bagian gen yang konservatif tersebut dan mengamplifikasinya. Produk PCR selanjutnya disekuensing dan diperoleh urutan nukleotidanya kemudian dapat dibandingkan dengan data bakteri yang telah diketahui dan dideterminasi (Dale & Park, 2010).

Kelompok bakteri aktinomiset telah banyak diketahui sebagai penghasil beberapa senyawa antibiotik seperti polyketides, -lactams dan peptida yang berfungsi sebagai anti fungal, anti tumor dan *immunosuppressive* (Behal, 2000). Genus *Kitasatospora* merupakan kelompok bakteri aktinomiset yaitu dari famili *Streptomycetaceae* (Groth et al., 2004).

Hasil identifikasi genotif selanjutnya terhadap isolat T5-1118 (*Chromobacterium* sp.) dan isolat R7-1018 (*Bacillus nealsonii*), dapat menjelaskan bahwa bakteri tersebut dapat menekan pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* berdasarkan hasil-hasil penelitian sebelumnya. Kim et al. (2014) melaporkan bahwa *Chromobacterium* sp. strain C61 menghasilkan antibiotik chromobactomycin yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa cendawan patogen dan menekan perkembangan beberapa penyakit tumbuhan. Demikian halnya dengan kelompok bakteri *Bacillus* juga telah banyak diketahui menghasilkan antibiotik seperti, iturin A, surfactins (Beric et al., 2012), bacillomycin D, mycosubtilin dan zwittermicin A (Pal & Gardener, 2006).



Gambar 3. Pengaruh senyawa bioaktif bakteri agensia hayati terhadap pertumbuhan populasi *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe IV. Huruf yang sama menunjukkan tidak berpengaruh nyata secara statistik berdasarkan uji Duncan dengan taraf nyata 5% terhadap kontrol

Tabel 3. Hasil analisis sekuen parsial gen 16S rRNA isolat bakteri dengan sekuen gen 16S rRNA di pusat data GenBank

Kode isolat	Spesies yang homolog	Kemiripan (%) No akses
T5-1105	<i>Streptomyces</i> sp. Antag1	98 (JQ417268.1)
T6-1109	<i>Kitasatospora nipponensis</i> H2-4	94 (HQ857768.1)
R7-1018	<i>Bacillus nealsonii</i> strain F22	99 (JQ579625.1)
T5-1118	<i>Chromobacterium</i> sp.MWU328	99 (JN653466.1)

Berdasarkan potensi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh keempat isolat tersebut maka, isolat ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai agensia hayati dalam menekan penyakit kresek yang disebabkan oleh *X. oryzae* pv. *oryzae*. Namun demikian perlu dilakukan pengujian lanjutan secara *inplanta* baik di rumah kaca maupun di lapangan untuk menguji keefektifannya dalam mengendalikan penyakit kresek.

SIMPULAN

Dari seleksi bakteri dari pertanaman padi diperoleh 11 isolat bakteri agensia hayati yang berpotensi dapat menghambat *X. oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VIII dan tidak bersifat patogenik terhadap tanaman. Karakterisasi terhadap 11 isolat tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut memiliki kemampuan kitinolitik (isolat T5-1118 dan R7-1018), melarutkan fosfat (T5-1105 dan T6-1109), dan

memproduksi siderofor (isolat T5-1118 dan T6-1109). Pengujian senyawa bioaktif dari masing-masing 4 isolat tersebut terhadap pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* secara *in vitro* menunjukkan bahwa isolat T5-1118, T5-1105, T6-1109 dan R7-1018 dapat menghambat pertumbuhan *X. oryzae* pv. *oryzae* pada 48 jam setelah inokulasi masing-masing sebesar 66,61; 62,4; 23,97 dan 12,40%. Selanjutnya hasil identifikasi dengan sekuensing parsial gen pengkode 16S rRNA terhadap keempat isolat tersebut adalah *Chromobacterium* sp. MWU328 (T5-1118), *Streptomyces* sp. Antag 1 (T5-1105), *Kitasatospora nipponensis* strain H2-4 (T6-1109) dan *Bacillus nealsonii* strain F22 (R7-1018).

SANWACANA

Penelitian ini merupakan salah satu bagian dari hasil penelitian KKP3N 2013 kerjasama dengan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian

Pertanian RI dengan judul: “Aplikasi Teknik Metagenom dalam Eksplorasi Agens Hayati dan Induksi Resistensi terhadap Penyakit Kresek yang Disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada Tanaman Padi”, No. Kontrak : 691/LB.620/I.1/2/2013 tanggal 25 Februari 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiansyah, Ilyas S, Sudarsono, & Machmud M. 2013. Karakterisasi rizobakteri yang berpotensi mengendalikan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan meningkatkan pertumbuhan tanaman padi. *J. HPT Tropika* 13(1): 42–51.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2014. Produksi padi, jagung dan kedelai (angka tetap tahun 2013). *Berita Resmi Statistik*. 50(7): 1–10.
- Behal V. 2000. Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* 47: 113–156.
- Beri T, Koji M, Stancovi S, Topisirovi L, Degrassi G, Myers M, Venturi V, & Fira D. 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol. Biotech.* 50(1): 25–31.
- Dale JW & Park SF. 2010. *Molecular Genetics of Bacteria*. 5thEd. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Doumbou CL, Salove MKH, Crawford DL, & Beaulieu C. 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and promote plant growth. *Phytoprotection* 82(3): 85–102.
- Garcion C, Lamotte O, & Métraux JP. 2007. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Walters D, Newton A, & Lyon G (Eds.). *Induced Resistance for Plant Defense: Sustainable Approach to Crop Protection*. pp. 109–132. Blackwell Publishing, Oxford.
- Goldstein AH. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hort.* 12(2): 185–193.
- Gross M. 1990. Siderophores and fluorescent pigments. In: Klement Z, Rudolph K, & Sand DC (Eds.). *Methods in Phytobacteriology*. pp. 434–438. Budapest, Hungary.
- Groth I, Rodriguez C, Schütze B, Schmitz P, Leistner E, & Goodfellow M. 2004. Five novel *Kitasatospora* species from soil: *Kitasatospora arboriphila* sp. nov., *K. gansuensis* sp. nov., *K. nipponensis* sp. nov., *K. paranensis* sp. nov. and *K. terrestris* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2121–2129.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, & Klopper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43(10): 895–914.
- Handelsman J & Stabb EV. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*. 8: 1855–1869.
- Hastuti RD, Lestari Y, Saraswati R, Suwanto A, & Chaerani. 2012. Capability of *Streptomyces* spp. in controlling bacterial leaf blight disease in rice plants. *Am. J. Agri. Biol. Sci.* 7(2): 217–223.
- Hoa PTP, Quang ND, Sakiyama Y, Hop DV, Hang DT, Ha TH, Van NT, Quy NTK, & Dao NTA. 2012. Screening for *Actinomyces* isolated from soil with the ability to inhibit *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial blight disease in Vietnam. *Afr. J. Biotechnol.* 11(80): 14586–14594.
- Kim HJ, Choi HS, Yang SY, Kim IS, Yamaguchi T, Sohng JK, Park SK, Kim JC, Lee CH, Gardener BM, & Kim YC. 2014. Both extracellular chitinase and new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61. *Mol. Plant Pathol.* 15(2): 122–132.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E & Goodfellow M (Eds.). *Nucleic acid Techniques in Bacterial Systematics*. pp. 115–175. John Wiley and Sons, Chichester, New York.
- Leifson E. 1956. Morphological and physiological characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Bacteriol.* 71(4): 393–400.
- Lingappa Y & Lockwood JL. 1962. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology* 52: 317–323.
- Lisboa MP, Bonatto D, Bizani D, Henriques JAP, & Brandelli A. 2006. Characterization of a bacteriosin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int. Microbiol.* 9: 111–118.

- Lyon G. 2007. Agens that can elicit induced resistance. In: Walters D, Newton A, & Lyon G (Eds.). *Induced Resistance for Plant Defense: Sustainable Approach to Crop Protection*. pp. 9–29. Blackwell Publishing, Oxford.
- Madigan MT, Martinko JM, & Parker J. 1997. *Brock's Biology of Microorganisms*. Ed ke-8. : Prentice-Hall, Inc New Jersey.
- Munif A, Wiyono S, & Suwarno. 2012. Isolasi bakteri endofit asal padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan. *J. Fitopatol. Indones.* 8(3): 57–64.
- Pal KK & Gardener BM. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. APSnet 25 p.
- Park SK, Lee MC, & Harman GE. 2005. The biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. strain C-61 against *Rhizoctonia solani* depends on the productive ability of chitinase. *Plant Pathol. J.* 21(3): 275–282.
- Rao SWCB & Sinha MK. 1962. Phosphate dissolving microorganism in the soil and rhizosphere. *Ind. J. Sci.* 23: 272–278.
- Santosa DA, Handayani N, & Iswandi A. 2003. Isolasi dan seleksi bakteri filosfer pemicu tumbuh dari daun padi (*Oryza sativa* L.) varietas IR64. *J. Tanah dan Lingkungan* 5(1): 7–12.
- Singh G, Maurya S, deLampasona MP, & Catalan C. 2005. Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potentials of *Anethumgraveolens* L. essential oil and acetone extract part 52. *J. Food Sci.* 70(4): 208–215.
- Suada IK, Suhartini DMWY, Sunariasih NPL, Wirawan IGP, Chun KW, Cha JY, & Ohga S. 2012. Ability of endophytic fungi isolated from rice to inhibit *Pyricularia oryzae*-induced rice blast in Indonesia. *J. Fac. Agr.* 57(1): 51–53.
- Suparyono, Sudir, & Suprihanto. 2004. Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Java. *Indones. J. Agric. Sci.* 5(2): 63–69.
- Suparyono & Sudir. 1992. Perkembangan penyakit bakterihawar daun pada stadia tumbuh yang berbeda dan pengaruhnya terhadap hasil padi. *Media Penelitian Sukamandi* 12: 6–9.
- Taechowisan T, Peberdy JF, & Lumyong S. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19(4): 381–385.
- Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, & Thomashow L. 2006. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Can. J. Microbiol.* 52: 56–65.
- Wahyudi AT, Astuti RI, & Giyanto. 2011. Screening of *Pseudomonas* sp. isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 6(1): 134–141.
- Walsh C. 2003. *Antibiotics: Action, Origins, Resistance*. 1st Edition. ASM Press, Washington.
- Yasmin F, Othman R, Sijam K, & Saad MS. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3(11): 815–821.