

Antagonisme beberapa bakteri endofit *Arecaceae* terhadap *Curvularia* sp. patogen penyebab bercak daun yang diisolasi dari tanaman kelapa kopyor

Antagonism of selected Arecaceae endophytic bacteria against Curvularia sp. leaf spot pathogen isolated from coconut kopyor

Deden Dewantara ERIS^{1*)}, Abdul MUNIF²⁾, Bonny PW SOEKARNO²⁾ & Agus PURWANTARA³⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl Taman kencana No 1 Bogor 16128, Indonesia

²⁾Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor, Jl Kamper, Kampus Darmaga, Bogor 16680

³⁾PT Mars Symbioscience Indonesia, Jl. Kima 10 Kav. A6, Kawasan Industri Makassar, Sulawesi Selatan 90241

Diterima tgl 7 Mei 2018/ disetujui tgl 13 September 2018

Abstract

Coconut kopyor is one of the most important commodities. One of the problems in coconut kopyor cultivation is grey leaf spot disease caused by Curvularia sp. Using endophytic bacteria is one of the control technique that is environmentally friendly. A total of 40 selected endophytic Arecaceae bacteria isolated from coconut kopyor, palm oil, aren, nibung and pejibaye were tested for their inhibitory ability to Curvularia sp. through antibiotic and volatile organic compound (VOC) test. The antibiotic test showed that thirty three endophytic bacteria isolates have inhibitory capacity against Curvularia sp. in a range of inhibition from 4.4% to 86.6%. Isolates with the highest inhibition were EAKSS 502, EAKSS 520 and EAKSS 507. VOC test showed that EAPJN 216, EAKSS 532, EAAPN 225, EAAPN 506, EAAPN 507 and EAAPN 557 were produced VOC that suppressed the growth of Curvularia sp fungal colonies in a range from 92.27% to 97.21%. Based on the best combination of antibiotic and production of volatile organic compound test, there were four potential isolates to inhibit the growth of Curvularia sp. in vitro i.e. EAKSS 502, EAKSS 507, EAKPN 201 and EAPJN 216. Those isolates were molecularly identified as Serratia marcescens strain PIGB81, Burkholderia sp. DOP Ma316, S. marcescens strain RY21 and S. marcescens strain LB21. The four isolates were isolated from different plants such oil palm, coconut kopyor and pejibaye.

[Keywords: antibiotics, Burkholderia, malformation, Serratia, suppression, volatile compound]

Abstrak

Kelapa kopyor saat ini menjadi salah satu komoditas perkebunan yang penting. Salah satu masalah dalam pembudidayaan kelapa kopyor adalah serangan penyakit bercak kelabu yang disebabkan oleh cendawan *Curvularia* sp. Penggunaan bakteri endofit merupakan salah satu cara control yang ramah lingkungan. Sebanyak 40 isolat bakteri endofit asal tanaman *Arecaceae* diisolasi dari tanaman kelapa kopyor, kelapa sawit, aren, nibung dan pejibaye diujikan kemampuan penghambatannya terhadap *Curvularia* sp. melalui uji antibiosis dan uji produksi senyawa organik volatil (VOC). Uji antibiosis menunjukkan sebanyak 33 isolat bakteri endofit menunjukkan daya penghambatan terhadap cendawan *Curvularia* sp. dengan kisaran 4,4%-86,6%. Penghambatan terbesar yakni isolat EAKSS 502, EAKSS 520 dan isolat EAKSS 507. Pengujian produksi senyawa organik volatil menunjukkan EAPJN 216, EAKSS 532, EAAPN 225, EAAPN 506, EAAPN 507 dan EAAPN 557 menghasilkan komponen volatil organik yang menekan pertumbuhan koloni cendawan *Curvularia* sp. pada kisaran 92,27%-97,21%. Berdasarkan kombinasi data pengujian antibiosis dan produksi senyawa organik volatil terdapat 4 isolat bakteri endofit yang berpotensi menghambat perkembangan *Curvularia* sp. yaitu isolat EAKSS 502, EAKSS 507, EAKPN 201 dan EAPJN 216. Hasil identifikasi secara molekuler keempat isolat tersebut berturut-turut adalah *Serratia marcescens* strain PIGB81, *Burkholderia* sp. DOP Ma316, *S. marcescens* strain RY21 dan *S. marcescens* strain LB21. Keempat isolat tersebut diisolasi dari tanaman yang berbeda yakni kelapa sawit, kelapa kopyor dan pejibaye.

*) Penulis korespondensi: dewantara40@gmail.com

[Kata kunci: antibiotik, *Burkholderia*, malformasi, penghambatan, *Serratia*, komponen volatil].

Pendahuluan

Kelapa kopyor (*Cocos nucifera* L. var. kopyor) saat ini semakin dikenal dan diminati oleh masyarakat. Buah kelapa kopyor memiliki rasa yang lezat dengan endosperm (daging buah) yang sebagian besar terlepas disertai volume air kelapa yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelapa normal. Keistimewaan kopyor dan harga yang bisa mencapai 5-6 kali harga kelapa normal menyebabkan usaha budidaya kelapa kopyor semakin menarik, diminati banyak orang mulai dari petani, Dinas Perkebunan, pengusaha serta pelaku bisnis lainnya.

Pembudidayaan kelapa kopyor bukan tanpa masalah. Salah satu penyakit tanaman yang menyerang tanaman kelapa kopyor di pembibitan dan tanaman muda diantaranya penyakit bercak daun kelabu yang disebabkan oleh *Curvularia* sp. Kittimorakul *et al.*, (2013) menyatakan bahwa tingkat keparahan penyakit bercak daun dapat terjadi hingga 61%. Serangan *Curvularia* sp. mengakibatkan kerusakan jaringan yang menyebabkan tanaman tidak dapat tumbuh secara optimal bahkan menuju kematian.

Salah satu teknik penanggulangan penyakit tanaman adalah dengan memanfaatkan bakteri endofit. Bakteri endofit merupakan bakteri yang dapat hidup, berkembang dengan baik, berasosiasi di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tanaman tersebut (Hallmann, 2001). Bakteri endofit bersimbiosis dengan tanaman, memperoleh nutrisi yang berasal dari hasil metabolisme tanaman. Bakteri endofit selain memperoleh nutrisi dari tanaman juga memproteksi tanaman dari patogen selama hidupnya (Tanaka *et al.*, 1999; Adeline *et al.*, 2008).

Pemanfaatan bakteri endofit dalam pengendalian penyakit diantaranya adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dan agens pengendali *Ganoderma* pada bibit tanaman kelapa sawit (Sapak *et al.*, 2008). Pada kopi dan tanaman lada aplikasi bakteri endofit perakaran mampu menekan perkembangan penyakit yang disebabkan oleh serangan nematoda (Munif & Giyanto, 2015; Harni & Munif, 2012). Pada kelapa kopyor Eris *et al.*, (2017) melaporkan potensi bakteri endofit dalam mengendalikan patogen *Pestalotiopsis* sp. penyebab penyakit bercak daun. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri endofit asal tanaman *Areaceae* terseleksi yang memiliki kemampuan penghambatan terhadap

cendawan *Curvularia* sp. penyebab bercak daun kelabu pada kelapa kopyor.

Bahan dan Metode

Isolasi bakteri endofit dan cendawan patogen bercak Curvularia sp.

Sampel akar dan daun tanaman pebibaye (*Bactris gasipaes*), kelapa kopyor (*Cocos nucifera*), kelapa sawit (*Elaeis guinensis*), aren (*Arenga pinnata*) dan nibung (*Oncosperma filamentosa*) diperoleh dari wilayah dataran rendah Bogor yakni kawasan Dramaga dan Ciampea. Sampel tersebut dibawa ke laboratorium dan dipotong berukuran 3-4 cm². Selanjutnya dilakukan ekstraksi untuk memperoleh isolat bakteri endofit (Rajendran *et al.*, 2012; Munif *et al.*, 2012).

Untuk mengisolasi cendawan *Curvularia* sp., jaringan daun kelapa kopyor bergejala bercak kelabu dipotong-potong hingga berukuran 2-4 cm². Potongan daun disterilisasi permukaan dengan perendaman pada NaOCl 2% selama 3 menit, alkohol 70 % selama 2 menit dan diakhiri dengan bilasan air steril sebanyak 3 kali. Jaringan daun kemudian ditanam pada cawan Petri berisi media PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruangan. Pertumbuhan cendawan diamati setiap hari, dimurnikan dan secara berkala diremajakan pada media PDA dalam cawan Petri dan tabung reaksi.

Uji antibiosis

Uji antibiosis bakteri endofit dilakukan menggunakan media PDA pada suhu ruang selama 7 hari mengacu pada Munif *et al.*, (2012). Pada akhir masa inkubasi (hari ke-7 pengamatan), daya penghambatan dihitung dengan formula $((R1-R2)/R1) \times 100\%$; dimana R1 adalah jari-jari koloni cendawan patogen yang menjauhi koloni bakteri endofit dan R2 adalah jari-jari koloni cendawan patogen yang mendekati koloni bakteri endofit (Munif *et al.*, 2012; Eris *et al.*, 2017).

Uji produksi senyawa organik volatil (volatile organic compound/VOC) terhadap perkembangan cendawan Curvularia sp.

Pengujian ini, dilakukan dengan menggunakan 2 buah cawan Petri berukuran sama yang dilekatkan saling telungkup. Cawan bagian atas berisi media *Nutrient Agar* (NA) dengan kultur bakteri endofit berusia 2 hari. Cawan bagian bawah berisi media PDA dengan kultur cendawan patogen *Curvularia* sp berusia 7 hari berbentuk lingkaran dengan diameter 10 mm. Kultur cendawan *Curvularia* sp. dilekatkan berhadapan dengan kultur bakteri menggunakan *sealer* atau selotip (sehingga kondisi kedap udara) dan diinkubasikan selama 7 hari pada suhu ruang. Pengama-

tan dilakukan pada hari ke-7 dengan cara mengukur diameter koloni cendawan (Yuan *et al.*, 2012). Sebanyak 4 isolat bakteri endofit dengan persentase hambatan di atas 50% berdasarkan pengujian antibiosis sebagai pertimbangan utama dan uji senyawa organik volatil dipilih untuk selanjutnya diidentifikasi secara molekuler.

Identifikasi bakteri endofit secara molekuler

Isolasi DNA bakteri endofit

Empat isolat bakteri endofit terpilih berdasarkan kombinasi data uji antibiosis dan uji produksi senyawa organik volatil. Isolat tersebut antara lain EAKSS 502, EAKSS 507, EAKPN 201 dan EAPJN 216 dipilih untuk diidentifikasi secara molekuler. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit isolasi DNA *ExgeneTM Cell SV*, mengikuti protokol isolasi DNA bakteri Gram positif pada *GeneAll ExgeneTM Protocol Handbook*. Hasil isolasi DNA diukur dengan spektrofotometer Nanodrop 2000TM untuk mengetahui konsentrasi DNA yang tepat sebagai template pada analisis PCR. DNA hasil isolasi dielektroforesis di dalam larutan buffer TBE 0,5x pada mesin elektroforasi berarus listrik 42 mA dan tegangan 80 volt selama 42 menit. Visualisasi DNA dilakukan menggunakan GeldocTM.

Amplifikasi DNA dengan PCR standar menggunakan primer universal 16S rRNA

DNA isolat bakteri endofit diamplifikasi dengan primer universal 16S rRNA. Primer yang digunakan adalah Primer forward 8F dengan urutan basa 5-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3 dan Primer reverse U1492R dengan urutan basa 5-GTT TAC CTT GTT ACG ACTT-3 (Surajit *et al.*, 2014). Campuran reagen PCR menggunakan mix PCR KappaTM sebagaimana tercantum pada Tabel 1. Siklus PCR meliputi tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit dan 15 detik, tahap *annealing* pada suhu 46°C selama 15 detik, tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 15 detik dan 7 menit. Total siklus dalam PCR

standar ini adalah 35 siklus dengan waktu keseluruhan selama 1 jam 4 menit. Selanjutnya gel agarose 1,5% (w/v) dipersiapkan dengan pelarut buffer TBE 0,5x. Elektroforesis dilakukan pada mesin elektroforasi pada arus listrik 40 mA dengan tegangan 60 volt selama 60 menit. Penanda ukuran DNA (marker) menggunakan 1 kb ladder. Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan GeldocTM.

Empat sampel DNA bakteri endofit potensial hasil amplifikasi dengan PCR diurutkan susunan basa-basanya menggunakan *1st Base DNA Sequencing Services* Singapura. Urutan basa-basa DNA hasil *sequencing* kemudian disejajarkan menggunakan program BioEdit *Sequence Alignment Editor* dan dianalisis lebih lanjut dengan program BLAST-N pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov untuk mengetahui spesies isolat bakteri endofit.

Hasil dan Pembahasan

Isolat cendawan patogen bercak daun

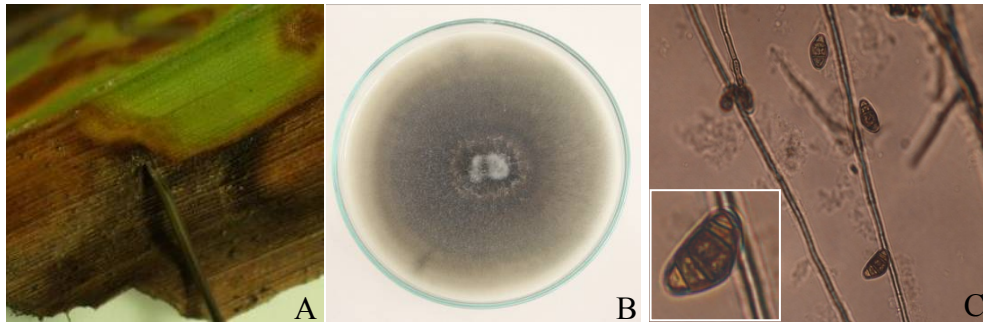
Konidia cendawan *Curvularia* sp. berukuran 24-40 x 12-22 μm memiliki yang terbagi-bagi, hampir *ovoid* (bentuk telur) atau hampir elips dengan sel kedua dari dasar berukuran paling besar (Kittimorakul *et al.*, 2013) (Gambar 1). Gejala penyakit yang disebabkan oleh cendawan *Curvularia* sp. diawali dengan munculnya bercak kecil kekuningan yang perlahan berubah kecoklatan dan lama kelamaan menjadi coklat kehitaman yang menyerang seluruh bagian daun (Kittimorakul *et al.*, 2013).

Uji antibiosis bakteri endofit terhadap cendawan penyebab penyakit bercak daun

Daya penghambatan bakteri endofit terhadap cendawan *Curvularia* sp. ditunjukkan oleh 33 isolat bakteri endofit (75%) dari 40 isolat yang diuji. Lima isolat dengan daya penghambatan terbesar adalah isolat EAKSS 502, EAKSS 520, EAKSS 507, EAKSS 508, dan EAKSS 529.

Tabel 1. Jenis pereaksi yang digunakan dalam PCR standar
Table 1. Reagents that used in standard PCR

Jenis pereaksi <i>Kind of reagen</i>	Volume Reaksi PCR <i>PCR reaction volume</i>	
	1x (μL)	6x (μL)
Mix PCR Kappa	12,5	75
Primer Forward 16S rRNA 8F (5-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3)	1,25	7
Primer Reverse 16S rRNA U1492R (5-GTT TAC CTT GTT ACG ACTT-3)	1,25	7
DNA	0,5	3
Air bebas nuklease/ <i>free nuclease water</i>	9	54
Total	24,5	



Gambar 1 Gejala penyakit bercak daun *Curvularia* (A); Kultur murni cendawan *Curvularia* sp. (B); konidia cendawan *Curvularia* sp. (C)

Figure 1 *Curvularia* leaf spot symptom (A); Isolate of *Curvularia* sp. (B); Conidia of *Curvularia* sp. (C)

Sementara itu daya penghambatan pertumbuhan cendawan *Curvularia* sp. terkecil teramati pada isolat EAAPN 225, EDPJ 006, EAONN 545, EAKPS 503, EAKSS 515 dan EAKSS 522. Tujuh isolat bakteri endofit tidak menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan cendawan *Curvularia* sp. yaitu EAKSS 514, EDKS 006, EAKPS 501, EAAPN 237, EAAPN 238, EAAPN 508 dan EDAPN 202 (Tabel 2). Bakteri endofit memiliki kemampuan menghasilkan metabolit atau senyawa kimia tertentu yang menghambat pertumbuhan cendawan patogen bercak daun (Akbaba & Ozaktan, 2018). Senyawa tersebut bergerak melalui pori-pori media agar hingga mempengaruhi pertumbuhan koloni cendawan. Berdasarkan pengamatan, mekanisme penghambatan bakteri endofit *Arecaceae* terhadap perkembangan cendawan *Curvularia* sp. adalah antibiosis dan lisis (Gambar 2).

Pengamatan mikroskopis terhadap pertumbuhan miselium cendawan *Curvularia* sp. menunjukkan terjadinya respons perubahan warna hifa (menjadi berwarna oranye) secara lokal pada tepi koloni *Curvularia* sp. disertai dengan penghambatan pertumbuhan koloni cendawan *Curvularia* sp. Respons berikutnya berupa penghambatan pertumbuhan koloni patogen tanpa perubahan warna koloni. Respons lain yang diperoleh pada pengamatan yakni terjadinya perubahan morfologi koloni ditunjukkan dengan hifa bagian tepi menjadi menebal dan menghitam yang disertai dengan penghambatan pertumbuhan koloni patogen (Gambar 2). Perubahan bentuk hifa (malformasi) cendawan patogen *Curvularia* sp. yang diakibatkan oleh bakteri endofit mendukung hasil yang dilaporkan Compant *et al.* (2013) yang menunjukkan kemampuan bakteri endofit *Streptomyces alni* pada anggur dalam menghasilkan aktivitas penghambatan pertumbuhan, malformasi dan lisis hifa pada pengujian secara *in vitro*.

Daya penghambatan pertumbuhan dan perubahan warna miselium *Curvularia* sp.

merupakan hasil interaksi senyawa kimia yang diproduksi bakteri endofit terhadap cendawan *Curvularia* sp. Shalini dan Srivastava (2008) melaporkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* strains (PSB-1, PUR-46, R1, R2 and R3) menghasilkan senyawa kimia asam *phenazine-1-carboxylic* yang secara signifikan mampu menghambat perkembangan koloni cendawan *Curvularia lunata* hingga 96,07% bila diujikan pada dosis 5000 µg/mL. Sementara itu, cendawan *Curvularia* sp. dapat menghasilkan metabolit berupa curvularin (*curvulone A*, *hydroxycurvularin*, dan *dehydroxycurvularin*) yang mampu memberikan pengaruh anti bakteri (Zhang *et al.*, 2011). Dengan demikian daya penghambatan yang tinggi oleh bakteri endofit terhadap cendawan *Curvularia* sp. diduga disebabkan sifat antibiotik senyawa sekunder yang dihasilkan bakteri endofit lebih kuat dibandingkan dengan metabolit sekunder yang dihasilkan cendawan *Curvularia* sp.

Pengaruh VOC terhadap perkembangan cendawan *Curvularia* sp.

Pengujian VOC bakteri endofit terhadap cendawan *Curvularia* sp. menunjukkan sebanyak 7 isolat bakteri endofit (EAPJN 216, EAKSS 532, EAAPN 225, EAAPN 506, EAAPN 507 dan EAAPN 557) menghasilkan senyawa organik volatil dan mampu menghambat pertumbuhan *Curvularia* sp. (Gambar 3). Isolat isolat tersebut mampu menyebabkan pertumbuhan *Curvularia* sp. berkisar antara 2,79% - 7,72% dibandingkan dengan kontrol yang mencapai 100%. Hal ini membuktikan bahwa isolat-isolat bakteri endofit tersebut mampu menghasilkan senyawa menguap (bersifat volatil) yang berpengaruh terhadap perkembangan *Curvularia* sp. penyebab bercak daun kelabu pada kelapa kopyor secara *in vitro*. Senyawa organik volatil tersebut salah satunya adalah senyawa fenolat yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma cendawan patogen (Liswami & Nurbailis, 2018).

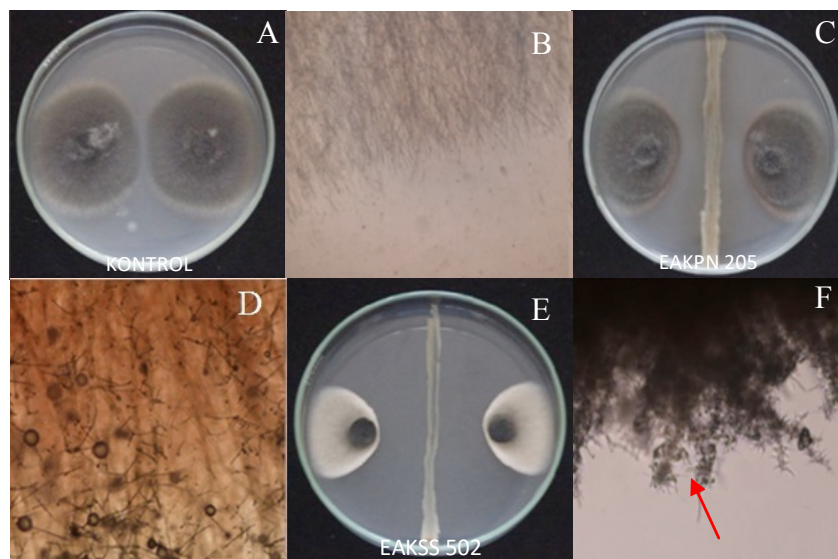
Tabel 2. Persentase penghambatan bakteri endofit asal *Arecaceae* terhadap cendawan *Curvularia* sp. patogen penyebab penyakit bercak daun

Table 2. Result of antibiosis test of endophytic *Arecaceae* bacteria to *Curvularia* sp. pathogen that cause fungal leaf spot disease

Isolat bakteri endofit <i>Endophyte bacteria isolates</i>	Penghambatan (%) <i>Inhibition (%)</i>	Isolat bakteri endofit <i>Endophyte bacteria isolates</i>	Penghambatan (%) <i>Inhibition (%)</i>
EAPJN 207	68,2 c	EDKS 022	39,1 i
EAPJN 212	57,5 ef	EDKS 023	33,3 i
EAPJN 216	56,0 fg	EDKS 006	0,0 o
EAPJS 208	59,0 ef	EAKPN 201	52,5 gh
EDPJ 006	7,1 mn	EAKPN 205	65,2 cd
EAKSS 502	86,6 a	EAKPS 501	0,0 o
EAKSS 507	83,0 ab	EAKPS 503	6,6 mn
EAKSS 508	79,8 b	EAKPS 504	30,1 jk
EAKSS 509	79,0 b	EAAPN 207	33,3 i
EAKSS 510	65,0 cd	EAAPN 225	7,9 m
EAKSS 512	60,0 ef	EAAPN 226	26,1 k
EAKSS 514	0,0 o	EAAPN 237	0,0 o
EAKSS 515	4,4 mno	EAAPN 238	0,0 o
EAKSS 518	52,2 gh	EAAPN 507	40,0 i
EAKSS 520	84,8 a	EAAPN 508	0,0 o
EAKSS 522	2,3 no	EAAPN 557	20,0 l
EAKSS 523	69,9 c	EDAPN 202	0,0 o
EAKSS 529	79,5 b	EDAPN 212	27,3 k
EAKSS 532	49,8 h	EAONN 545	6,8 mn
EDKS 001	61,9 de	EAONS 506	17,7 l
		Kontrol/ Control	0,0 o

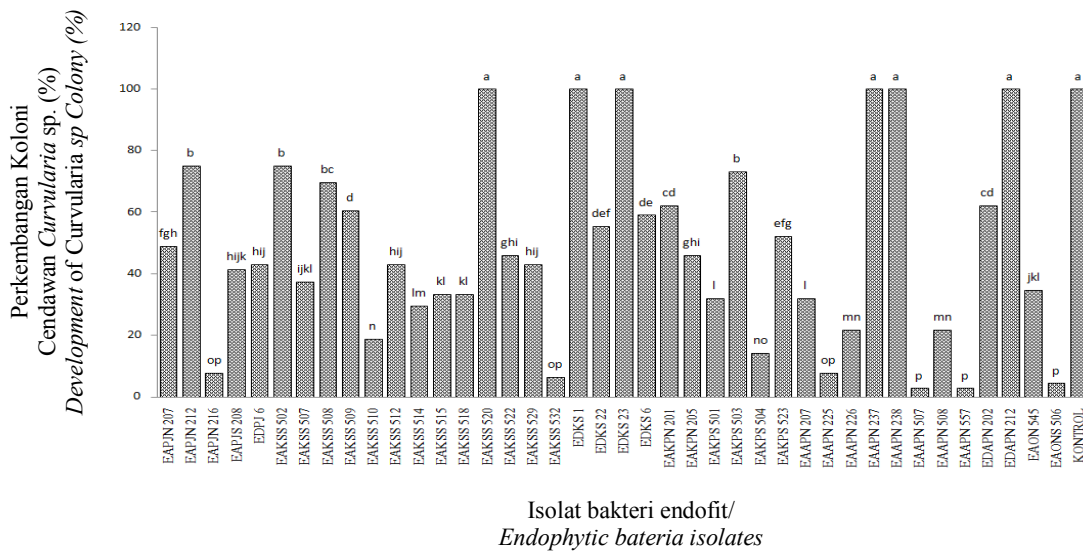
*) Angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$

*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$



Gambar 2 Uji antibiosis bakteri endofit terhadap cendawan *Curvularia* sp. Perlakuan kontrol tidak terbentuk zona hambat (A); Hifa cendawan *Curvularia* sp. normal pada kontrol (B); Uji antibiosis bakteri endofit EAKPN 205 terhadap cendawan *Curvularia* sp., terbentuk zona hambat dan perubahan warna hifa (C); Hifa cendawan *Curvularia* sp. mengalami perubahan warna (D); Uji antibiosis bakteri endofit EAKSS 502 terhadap cendawan *Curvularia* sp., terbentuk zona hambat dan malformasi (E); Hifa cendawan *Curvularia* sp. mengalami malformasi (F).

Figure 2. Antibiotic test of *Arecaceae* endophytic bacteria to *Curvularia* sp. Control treatment has not produced inhibition zone (A); Normal *Curvularia* sp. mycellium on control (B); Inhibition zone formation and discoloration between EAKPN 205 isolate and *Curvularia* sp.(C); Discoloration of *Curvularia* sp. mycellium as an antibiotic effect from endophyte isolate (D); Inhibition zone and malformation formation of *Curvularia* sp. against EAKSS 502 (E); Malformation of *Curvularia* sp. mycellium as a response to antibiotic of endophyte isolate (F).



Gambar 3. Pengaruh senyawa organik volatil (VOC) yang dihasilkan bakteri endofit terhadap perkembangan cendawan *Curvularia* sp.

Figure 3. The effect of volatile organic compounds (VOCs) produced by endophytic bacteria on the growth of *Curvularia* sp.

Enam isolat bakteri endofit lain yang diujikan tidak memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan cendawan *Curvularia* sp. Pada perlakuan isolat bakteri endofit tersebut, pertumbuhan koloni *Curvularia* sp. tidak berbeda nyata dengan kontrol. Isolat bakteri endofit tersebut adalah isolat EAKSS 520, EDKS 1, EDKS 23, EAAPN 237, EAAPN 238 dan EDAPN 212 (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa isolat-isolat bakteri endofit tersebut tidak memproduksi senyawa organik volatil sehingga pertumbuhan hifa cendawan *Curvularia* berkembang secara normal. Bakteri endofit tersebut diduga memiliki peranan terhadap perkembangan tanaman diluar kemampuan untuk menghambat patogen (Ilmiyah *et al.*, 2015).

Identifikasi bakteri endofit dengan primer universal 16S rRNA

Identifikasi secara molekuler dilakukan untuk mengetahui identitas ke-4 isolat bakteri endofit potensial yang dipilih berdasarkan kombinasi data pengujian antibioisis dan produksi senyawa organik volatil. Terdapat 3 isolat bakteri endofit yang berpotensi menghambat perkembangan *Curvularia* sp. berdasarkan uji antagonis yaitu isolat EAKSS 502, EAKSS 507, EAKPN 201 dan satu isolat bakteri endofit potensial berdasarkan uji VOC yaitu EAPN 216. Empat genom DNA isolat bakteri endofit potensial diisolasi menggunakan Kit isolasi DNA ExgeneTM Cell SV menghasilkan kualitas DNA ± 1,9 pada rasio A260/A280. Selanjutnya genom DNA diidentifikasi berdasarkan penanda gen 16S rRNA, yakni bagian DNA yang sangat terjaga (*conserved*) dalam sel

yang menyandikan sejumlah protein subunit kecil ribosom (*small subunit ribosom*) (Stiegler *et al.*, 1981). Hasil amplifikasi DNA ke empat isolat yang diuji yakni berupa amplicon berukuran ±1500 bp, hal ini sesuai dengan Surajit *et al.*, (2014). Hasil visualisasi berupa pita DNA disajikan pada Gambar 4.

Hasil identifikasi molekuler empat isolat bakteri endofit dengan kemampuan antibioisis dan produksi senyawa organik volatil kuat secara berturut-turut dapat dilihat pada Tabel 3. Keempat isolat tersebut merupakan hasil isolasi dari tanaman yang berbeda yakni tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis*), kelapa kopyor (*Cocos nucifera*) dan pejibaye (*Bactris gasipaes*).

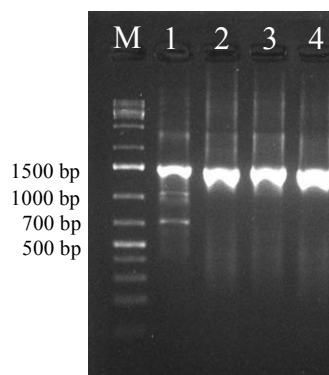
Bakteri *Serratia marcescens* diketahui mampu memproduksi IAA, senyawa kimia anti patogen dan enzim pendegradasi kitin. Selvakumar *et al.*, (2008) melaporkan *S. marcescens* mampu memproduksi enzim pendegradasi kitin yang berperan dalam menghambat perkembangan patogen. Vaaje-Kolstad *et al.*, (2013) melaporkan bahwa *S. marcescens* memiliki empat enzim pendegradasi kitin aktif yaitu ChiC, Chia dan Chib serta CBP21. Pada penelitian ini diketahui bahwa tanaman aren (*Arenga pinnata*) menjadi inang bakteri *S. marcescens*.

Genus *Serratia* berbentuk batang, masuk dalam bakteri Gram negatif, membentuk endospora, bersifat anaerob fakultatif termasuk ke dalam famili Enterobacteriaceae (Li *et al.*, 2015). Bakteri genus ini hidup dan berkembang pada beragam habitat diantaranya tanah (Lavania & Nautiyal 2013), sebagai endofit tanaman (Lim *et al.*, 2015;.

Afzal *et al.*, 2016; Zaheer *et al.*, 2016), hidup di gua kelelawar (García-Fraile *et al.*, 2015), hidup dalam jaringan tubuh nematoda (Abebe-Akele *et al.*, 2015; Vicente *et al.*, 2016), dan manusia (Bonnin *et al.*, 2015). *Serratia* mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui produksi senyawa siderophores, lipokitin, oligosakarida oleh karena itu dikelompokkan sebagai rhizobakteria perangsang pertumbuhan tanaman (Purushotham *et al.*, 2012). Genus ini diketahui pula mampu menghasilkan sejumlah senyawa kimia yang mampu menghambat perkembangan mikroorganisme lain seperti prodiginine (*prodigiosin*, *undecylprodigiosin*, *cycloprodigiosin*, *cyclononylprodigiosin*, *butylmeta-cyclo-heptylprodiginine*) yang diproduksi dan disekresikan oleh *Serratia* dan menjadi anti mikroba penciri khas genus tersebut (Williamson *et al.*, 2006).

Isolat EAKSS 507 diidentifikasi sebagai bakteri *Burkholderia* sp. berdasarkan analisis program Blast. Isolat EAKSS 507 memiliki tingkat penghambatan berupa antibiosis yang cukup tinggi

terhadap 3 cendawan bercak yang diujikan secara *in vitro*. Jiang *et al.* (2008) melaporkan bahwa bakteri endofit *Burkholderia* mampu melarutkan fosfat, memproduksi ACC deaminase, IAA, siderofor, dan melarutkan logam berat. Saxena (2010) melaporkan terdapat strain bakteri *Bulkholderia* yang mampu menghasilkan enzim pendegradasi kitin. Shimosaka *et al.*,(2001) juga melaporkan terdapat 2 gen pengkode kitinase yang diperoleh dari *Burkholderia* spp yakni kitinase A dan B (ChiA and ChiB). Li *et al.*, (2011) melaporkan bahwa rhizobakterium *Burkholderia* mampu mengurangi kejadian dan keparahan penyakit hawar pelepah pada padi pada kondisi rumah kaca. Isolat EAKSS 507 diidentifikasi sebagai *Burkholderia* sp. strain *DOP Ma316* yang diperoleh dari akar tanaman kelapa sawit, hal ini mendukung Sapak *et al.* (2008) yang menyatakan terdapat bakteri endofit *Burkholderia* dari akar tanaman kelapa sawit, yang mampu menurunkan insidensi penyakit, salah satunya busuk pangkal batang hingga 42% pada 8 bulan setelah inokulasi.



Gambar 4 Elektroforegram hasil PCR isolat bakteri endofit *Areceaceae* potensial menggunakan Primer 16S rRNA, secara berurutan dari kiri ke kanan: 1 kb ladder (M), isolat bakteri endofit EAKSS 502 (1), EAKSS 507 (2), EAPJN 216 (3) dan EAKPN 201(4)

Figure 4 Electroforegram of potential endophytic *Areceaceae* bacteria isolates PCR product amplified using 16S rRNA Primer, sequentially from left to right: 1 kb ladder (M), endophytic bacterial isolates EAKSS 502 (1), EAKSS 507 (2), EAPJN 216 (3) and EAKPN 201 (4)

Tabel 3. Hasil identifikasi 4 isolat bakteri endofit potensial secara molekuler
Table 3. Molecular identification of 4 isolates of potential endophytic bacteria

Isolat <i>Isolates</i>	Dasar pemilihan <i>Choice Reason</i>	Identitas <i>Identity</i>	Kode akses <i>Accession code</i>	Identitas matriks (%) <i>Identity matrix (%)</i>	Query cover (%)
EAKSS 502	Antibiosis kuat/ <i>strong antibiotic respons</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain PIGB81	KU364021.1	94	98
EAKSS 507	Antibiosis Kuat/ <i>strong antibiotic respons</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>DOP Ma316</i>	KT993571.1	94	99
EAKPN 201	Antibiosis kuat/ <i>strong antibiotic respons</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain RY21	KC790294.1	94	98
EAPJN 216	VOC kuat/ <i>strong VOC</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain LB21	KC335216.1	94	99

Kesimpulan

Sebanyak 33 isolat bakteri endofit dari 40 isolat terseleksi menunjukkan daya penghambatan terhadap cendawan *Curvularia* sp. yang diisolasi dari kelapa kopyor pada uji antibiosis dengan kisaran penghambatan 4,4% - 86,6%. Lima isolat dengan nilai penghambatan terbesar berdasarkan uji antibiosis adalah EAKSS 502, EAKSS 520, EAKSS 507, EAKSS 508 dan EAKSS 529. Pada pengujian produksi senyawa organik volatil, isolat EAPJN 216, EAKSS 532, EAAPN 225, EAAPN 506, EAAPN 507 dan EAAPN 557 menghasilkan senyawa organik volatil yang menekan pertumbuhan koloni cendawan *Curvularia* sp. pada kisaran 92,27% - 97,21%. Berdasarkan kombinasi data pengujian antibiosis dan produksi senyawa organik volatil terpilih 4 isolat bakteri endofit yang berpotensi menghambat perkembangan *Curvularia* sp. yaitu isolat EAKSS 502, EAKSS 507, EAKPN 201 dan EAPJN 216. Isolat-isolat tersebut berhasil diidentifikasi secara berturut-turut sebagai bakteri *Serratia marcescens* strain PIGB81, *Burkholderia* sp. DOP Ma316, *S. marcescens* strain RY21 dan *S. marcescens* strain LB21.

Daftar Pustaka

- Abebe-Akele F, LS Tisa, VS Cooper, PJ Hatcher & E Abebe, WK Thomas (2015). Genome sequence and comparative analysis of a putative entomopathogenic *Serratia* isolated from *Caenorhabditis briggsae*. *BMC genomics* 16(1), 531.
- Adeline SYT, M Sariah, K Jugah, R Son & S Gurmit (2008). Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *Biocontrol* 53, 541-553.
- Afzal I, I Iqar, ZK Shinwari & A Yasmin (2016). Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation* 12(1), 1-10.
- Akbaba, M., & Ozaktan, H. (2018). Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28(1), 14.
- Bonnin RA, D Girlich, D Imanci, L Dortet & T Naas (2015). Draft genome sequence of the *Serratia rubidaea* CIP 103234T reference strain, a human-opportunistic pathogen. *Genome announcements* 3(6), 1340-1345.
- Compant S, Brader G, Muzammil S, Sessitsch A, Lebrhi A, & Mathieu F (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl* 58(4), 435-455.
- Eris DD, A Munif, BPW Soekarno & A Purwantara (2017). Penapisan dan potensi bakteri endofit asal tanaman *Arecaceae* sebagai agens pengendali hayati cendawan *Pestalotiopsis* sp. penyebab penyakit bercak daun pada kelapa kopyor (*Cocos nucifera*). *Menara Perkebunan* 85 (1), 19-27.
- García-Fraile P, M Chudickova, O Benada, J Pikula M & Kolarik (2015). *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65(1), 90-94.
- Hallmann J, A Quadt-Hallmann, WG Miller, RA Sikora & SE Lindow (2001). Endophyte colonization of plants by biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathol* 91, 415-422.
- Harni R & A Munif (2012). Pemanfaatan agens hayati endofit untuk mengendalikan penyakit kuning pada tanaman lada. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar* 3, 201-206.
- Ilmiyah Z (2015). Uji antagonisme jamur endofit tanaman stroberi terhadap *Alternaria alternata* jamur penyebab bercak daun (Leaf Spot) pada tanaman stroberi secara *in vitro*. *LenteraBio* 4(1), 19-24.
- Jiang CY, XF Sheng, M Qian & QY Wang (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 2, 157-64.
- Kittimorakul J, C Pomsuriya, A SunPapao & V Petcharat (2013). Survey and incidence of leaf blight and leaf spot disease of oil palm seedling in southern Thailand. *Plant Pathology Journal* 12(3), 149-153.
- Lavania M & CS Nautiyal (2013). Solubilization of Tricalcium phosphate by temperature and salt tolerant *Serratia marcescens* NBRI1213 isolated from alkaline soils. *African Journal of Microbiology Research* 7(34), 4403-4413.
- Li B, BP Liu, RR Yu, MM Lou, YL Wang, GL Xie, HY Li & GC Sun (2011). Phenotypic and molecular characterization of rhizobacterium *Burkholderia* sp. strain R456 antagonistic to *Rhizoctonia solani*, sheath blight of rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(10), 2305-2313.

- Lim YL, DR Yong, T Krishnan, KK Tee, WF Yin & KG Chan (2015). Complete genome sequence of *Serratia fonticola* DSM 4576 T, a potential plant growth promoting bacterium. *Journal of Biotechnology* 214, 43-44.
- Liswarni Y & Nurbailis MB (2018). Eksplorasi cendawan endofit dan potensinya untuk pengendalian *Phytophthora palmivora* penyebab penyakit busuk buah kakao. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON* 4(2), 231-235
- Munif A & Giyanto G (2015). Effectiveness of endophytic bacterial consortium of coffee plant on mortality of *Pratylenchus coffeae* in vitro. *Pelita Perkebunan* 31(3), 175-185.
- Munif A, S Wiyono & Suwarno (2012). Isolasi bakteri endofit asal padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 8(3), 57-64.
- Purushotham P, PPS Arun, JS Prakash & AR Podile (2012). Chitin binding proteins act synergistically with chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. *PLoS One* 7(5), 234-242.
- Rajendran L, G Karthikeyan, T Raguchander & R Sumiyappen (2012). Cloning and sequencing of novel endophytic *Bacillus subtilis* from coconut for the management of basal stem rot disease. *Asian Journal of Plant Pathology* 2(1), 1-14.
- Sapak Z, S Meon & Z Ahmad Mior (2008). Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* infection in oil palm. *International Journal of Agriculture & Biology* 10, 127-32.
- Saxena J (2010). Disease suppression and crop improvement in moong beans (*Vigna radiata*) through *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains isolated from semi arid region of Rajasthan, India. *BioControl* 55(6), 799-810.
- Selvakumar G, M Mohan, S Kundu, AD Gupta, P Joshi, S Nazim & HS Gupta (2008). Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in applied microbiology* 46(2), 171-175.
- Shalini & R Srivastava (2008). Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. *Elec J Env Agricult Food Chem* 7, 2789-2796.
- Shimosaka M, Y Fukumori, T Narita, XY Zhang, R Kodaira, M Nogawa & M Okazaki (2001). The bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101 produces two different kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases. *Journal of bioscience and bioengineering* 91(1), 103-105.
- Stiegler P, P Carbon, JP Ebel & C Ehresmann (1981). A General secondary-structure model for procaryotic and eucaryotic RNAs of the small ribosomal subunits. *European Journal of Biochemistry* 3, 487-95.
- Surajit D, R Hirak, Dash, M Neelam, C Jaya & K Supriya (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 103, 80-100.
- Tanaka M, H Sukiman, M Takebayashi, K Saito, M Suto, MS Prana & F Tomita (1999). Isolation, screening and phylogenetic identification of endophytes from plants in Hokaido Japan and java Indonesia. *Microbes and Environment* 14(4), 237-241.
- Vaaje-Kolstad G, SJ Horn, M Sorlie & VG Eijsink (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*—a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal* 280(13), 3028-3049.
- Vicente CS, Nascimento FX, Y Ikuyo, PJ Cock, M Mota & K Hasegawa (2016). The genome and genetics of a high oxidative stress tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BMC genomics* 17(1), 301.
- Williamson NR, PC Fineran, FJ Leeper & GP Salmond (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology* 4(12), 887-899.
- Yuan J, W Raza, Q Shen & Q Huang (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(16), 5942-594.
- Zaheer A, B Mirza, JE Mclean, S Yasmin, TM Shah, KA Malik & MS Mirza (2016). Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. *Research in Microbiology* 6(167), 510-520.
- Zhang YL, LC Kong, DH Jiang, CP Yin, QM Cai, Q Chen & JY Zheng (2011). Phytotoxic and antifungal metabolites from *Curvularia* sp. FH01 isolated from the gut of *Atractomorpha sinensis*. *Bioresource technology* 102(3), 3575-7.