

Skrining Bioantagonistik Bakteri untuk Agen Biokontrol *Rhizoctonia solani* dan Kemampuannya dalam Menghasilkan Surfaktin

Screening of bioantagonistic bacteria for biocontrol agent of *Rhizoctonia solani* and surfactin producer

YULIAR[▼]

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911.

Diterima: 19 Januari 2008. Disetujui: 15 Maret 2008.

ABSTRACT

The objective of this research was to screen 31 of bacteria isolates that have potency to control *Rhizoctonia solani* growth and isolates capability to produce surfactin. *R. solani* growth inhibition was performed uses paper discs containing a 5 days cultivation of isolates culture. Surfactin activity assay was performed on LB agar medium. Results of the screening showed that the highest growth inhibition was obtained for isolates code 5₄ (96.43%), KC₄ (93.45%), and 16₃ (93.19%). All of the isolates were coproducer of surfactin and iturin, and the highest biosurfactan index was obtained for isolate KB₂ (3.91). The four potential isolates were identified, as *Bacillus pantotheinticus* (isolate 5₄ and isolate 16₃), *Bacillus brevis* (isolate KC₄), and *Bacillus* sp (isolate KB₂).

© 2008 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: biocontrol, *Bacillus pantotheinticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus* sp., *Rhizoctonia solani*, surfactin.

PENDAHULUAN

Pestisida tidak hanya berdampak merugikan pada kesehatan manusia dan lingkungan, tetapi juga pada lahan pertanian dan menyebabkan produk pertanian tidak aman dikonsumsi. Adanya kandungan p,p'-DDT, dan fungisida (HCB) pada air susu ibu di Indonesia sebagaimana dilaporkan oleh Shaw *et al.* (2000), menjadi bukti bahwa pestisida dapat berakibat sangat merugikan kesehatan manusia. Mengingat dampak serius dari pemakaian pestisida kimia terhadap kesehatan manusia, lingkungan dan lahan pertanian, dan kepedulian terhadap pelestarian lingkungan telah menjadikan pentingnya agen biokontrol untuk dipelajari dan dikembangkan sebagai produser berbagai senyawa antibiotik yang aman digunakan untuk mengatasi masalah penyakit tanaman. Kesempatan untuk menemukan agen biokontrol untuk jamur patogen sangat besar, mengingat Indonesia merupakan negara dengan biodiversitas yang tinggi.

Bakteri sebagai agen biokontrol mempunyai beberapa kelebihan diantaranya; bakteri merupakan mikroorganisme yang banyak terdapat di tanah, produksi massa bakteri juga lebih mudah dan lebih cepat daripada mikroorganisme lain seperti jamur. Bakteri sebagai agen biokontrol yang pernah dilaporkan adalah *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Streptomyces* (Shoda, 2000). *Rhizoctonia*

solani adalah salah satu jamur patogen soilborne terpenting yang dapat berkembang pada kedua kultivasi, di tanah maupun tanpa tanah, penyebab penyakit pada padi, kacang, tomat, dan tanaman lainnya (Sneh *et al.*, 1991). Diantara golongan jamur, genus *Trichoderma* adalah agent biokontrol untuk *Rhizoctonia solani* (Lin *et al.*, 1994) dan dari golongan bakteri biasanya digunakan *Pseudomonas* dan *Bacillus* (Gasoni *et al.*, 1998).

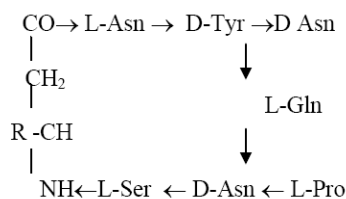
R. solani bersifat patogen pada kacang panjang (*Glycine max* (L.) Merr.) dan menyerang tunas tomat (*Solanum lycopersicon*) (Asaka and Shoda, 1996; Yu *et al.*, 2002). Mekanisme penghambatan pertumbuhan oleh agen biokontrol terhadap jamur patogen tanaman dapat melalui antibiotik yang dihasilkannya atau kompetisi makanan. Contoh antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan jamur misalnya iturin dan surfaktin (Huang *et al.*, 1993).

Iturin terdiri atas tujuh buah residu asam amino yang bersifat hidrofilik dan ekor hidrokarbon dengan panjang 10-13 karbon yang bersifat hidrofobik (Gambar 1 dan 2). Surfaktin adalah antibiotik yang memiliki kerja sebagai suatu biosurfaktan, surfaktin dapat merusak permeabilitas membran sel dengan cara menurunkan tegangan permukaan (Huang *et al.*, 1993). Surfaktin merupakan antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen, oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pengujian kemampuan isolat bakteri untuk menghasilkan surfaktin dengan indeks biosurfaktan tertinggi.

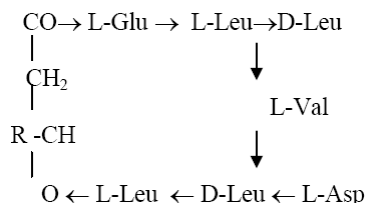
Penelitian ini bertujuan untuk menskrining 31 isolat bakteri yang berpotensi sebagai agen pengendali hayati *R. solani* dengan uji daya hambat terhadap pertumbuhan *R. solani* dan kemampuannya dalam menghasilkan surfaktin.

▼ Alamat korespondensi:

Jl. Raya Jakarta-Bogor, KM 46, Cibinong-Bogor 16911
Tel.: +62-21-765066 & Fax.: +62-21-8765062
e-mail: yriyria@yahoo.com



Gambar 1. Struktur iturin (Huang *et al.* 1993). R = CH₃(CH₂)₁₀-, CH₃CH₂(CH₃)CH(CH₂)₈-, (CH₃)₂CH(CH₂)₉-, CH₃(CH₂)₁₂-, (CH₃)₂CH(CH₂)₁₀-.



Gambar 2. Struktur surfaktin (Huang *et al.* 1993). R' = (CH₃)₂CH(CH₂)₉-

BAHAN DAN METODE

Bahan. Sebanyak 31 isolat bakteri, yaitu: isolat A₁₂, A₁₃, A₁₄, J₁₁, J₁₃, J₅₁, J₅₂, KB₂, KB₃, KB₄, KB₆, KC₂, KC₃, KC₄, KC₅, 1₃, 1₆, 1₉, 2₂, 2₂₄, 2₅₆, 3₂, 4₂, 6₂, 6₃, Y₁, 2₆₂, 2₆₄, 5₄, 5₅, 5₆), biakan *R. solani*, bubuk jagung dan kedelai (pakan ternak), polipepton, ekstrak khamir, NaCl, *Potato Dextrose Agar* (PDA), agar teknis, baktipepton, ekstrak daging sapi, susu skim, larutan garam fisiologis, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄·5H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄, MnCl₂, tripton, dekstroza KM, tributyrin, 0,85% NaCl dan akuades. Sumber Isolat adalah gambut, tanah sawah, tanah yang tanamannya berpatogen, tanah kebun, tanah lava gunung berapi, dan kompos.

Pembuatan media Luria Bertani (LB). Sebanyak 10 g polipepton, 5 g ekstrak khamir, dan 5 g NaCl dilarutkan dalam 1 L akuades. Lima mL larutan tersebut diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian disterilkan dengan otoklaf. Untuk LB agar ditambahkan 2% agar (w/v) dan setelah disterilkan, dituang ke dalam cawan petri di *laminar air flow hood*.

Pembuatan media produksi antibiotik. Media produksi antibiotik dibuat dengan melarutkan 2.5 g bubuk kedelai (pakan ternak), 1.5 g bubuk jagung (pakan ternak), 0.05 g KH₂PO₄, dan 0.025 g MgSO₄ ke dalam 50 mL akuades, kemudian disterilisasi menggunakan otoklaf.

Pembuatan media PDA. Media PDA dibuat dengan melarutkan 39 g PDA ke dalam 1 L akuades dan disterilisasi menggunakan otoklaf dan dituang ke dalam cawan petri di *laminar air flow hood*.

Pembuatan media Nutrien Agar. Media NA dibuat dengan melarutkan 5 g baktipepton, 3 g ekstrak daging sapi dan 22 g agar ke dalam 1 L akuades, dilarutkan dengan pengaduk magnet. Lima mL diambil menggunakan mikropipet ke dalam tabung reaksi dan disterilisasi menggunakan otoklaf.

Prekultivasi. Tabung reaksi berisi 5 mL LB steril diinokulasi dengan satu ose isolat bakteri yang diuji. Kemudian diinkubasikan pada shaker inkubator, suhu 37°C, 124 rpm, selama 16 jam.

Kultivasi. Media produksi antibiotik sebanyak 50 mL di dalam erlenmeyer (ukuran 200 ml) diinokulasi dengan 500 µL prekultivasi isolat bakteri. Diinkubasi selama 7 hari

menggunakan shaker. Uji *in vitro* dilakukan pada hari ke-5, menggunakan *paper disc*.

Uji *in vitro* kultivasi isolat terhadap *R. solani*. Petri yang berisi PDA steril diinokulasi bagian tengahnya dengan *R. solani* menggunakan ose jamur, ukuran dari miselia jamur yang diinokulasikan adalah 5x5 mm bujur sangkar. Selanjutnya di keempat bagian petri dengan jarak yang sama dari biakan *R. solani* diletakkan *paper disc* yang sebelumnya dicelupkan ke dalam kultivasi isolat yang telah diinkubasi selama 5 hari pada medium produksi antibiotik. Untuk perbandingan pertumbuhan *R. solani*, petri yang berisi PDA steril diinokulasi bagian tengahnya dengan *R. solani* yang berbentuk bujur sangkar ukuran 5x5 mm. Uji ini menggunakan empat ulangan. Persentase penghambatan pertumbuhan *R. solani* dihitung dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan } R. \text{ solani} = \frac{A_K - A_P}{A_K} \times 100\%$$

A K = luas biakan *R. solani* kontrol

A P = luas biakan *R. solani* perlakuan

Berdasarkan hasil penelitian terdahulu (Yuliar, 2002) didapatkan hasil bahwa produksi optimal senyawa antifungal, iturin A yang menghambat pertumbuhan *R. solani* adalah pada hari ke 5 inkubasi. Oleh karena itu agen biokontrol diinkubasi 5 hari pada media produksi untuk mendapatkan daya hambatnya yang optimal. Inkubasi 7 hari, dimaksudkan untuk melihat perubahan populasi dan pH agen biokontrol pada media produksi, yang ada hubungannya dengan produksi senyawa antifungal pada fase stationer dari grafik pertumbuhan. pH media kultivasi agen biokontrol cenderung basa pada waktu produksi senyawa antifungal.

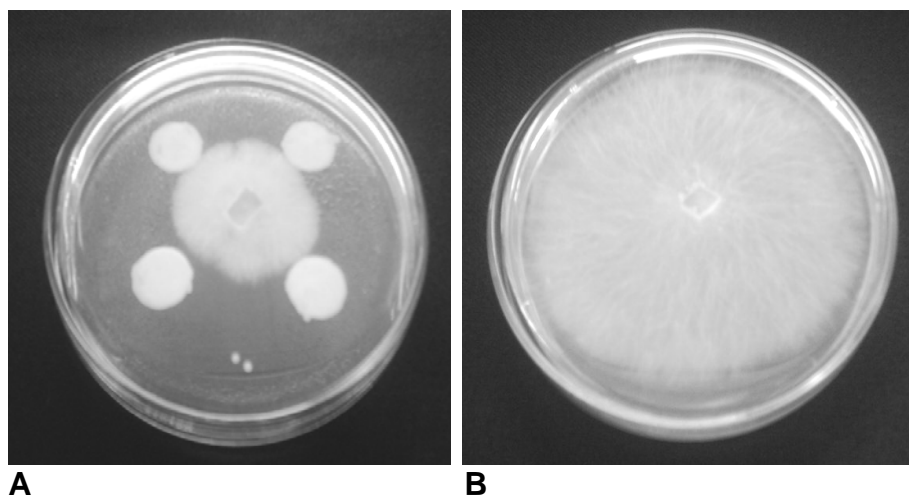
Pengukuran pH dan penghitungan populasi bakteri. Lima mL media produksi antibiotik pada hari ke-2,5 dan 7 disampling dan diukur pH-nya menggunakan pH meter (merk SCHOOT). Populasi bakteri dihitung menggunakan metode plate count, dari media produksi antibiotik diencerkan dengan larutan garam fisiologis steril dari pengenceran 10⁻² hingga 10⁻⁸, setelah itu sebanyak 100 µL dipipet ke dalam petri yang telah berisi LB agar dan diratakan dengan spatula kaca, diinkubasi selama 1-2 hari.

Uji aktivitas surfaktin. Tributyrin sebanyak 20 µL dipipet dan diratakan dengan spatula kaca ke dalam petri yang berisi agar LB. Isolat bakteri diinokulasikan dan diinkubasikan selama 2 hari. Zona bening yang terlihat menunjukkan bahwa isolat bakteri menghasilkan surfaktin. Zona bening akan diukur indeks biosurfaktannya, yaitu nisbah antara diameter zona bening dengan diameter isolatnya. Uji aktivitas ini menggunakan empat ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daya hambat isolat terhadap pertumbuhan jamur *R. solani*

Hasil uji daya hambat isolat terhadap pertumbuhan jamur patogen *R. solani* dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4. Hasil penelitian menunjukkan semua isolat mampu menghambat pertumbuhan *R. solani* dengan persentase sekitar 60% hingga 96%. Isolat dengan daya hambat terbesar adalah nomor 5₄ (96,43%), KC₄ (93,45%), dan 16₃ (93,19%). Huang *et al.* (1993) menyatakan bahwa uji daya hambat isolat terhadap pertumbuhan jamur *R. solani* merupakan uji semi kuantitatif penentuan kemampuan isolat bakteri untuk menghasilkan iturin. Penghambatan pertumbuhan *R. solani* oleh 31 isolat bakteri

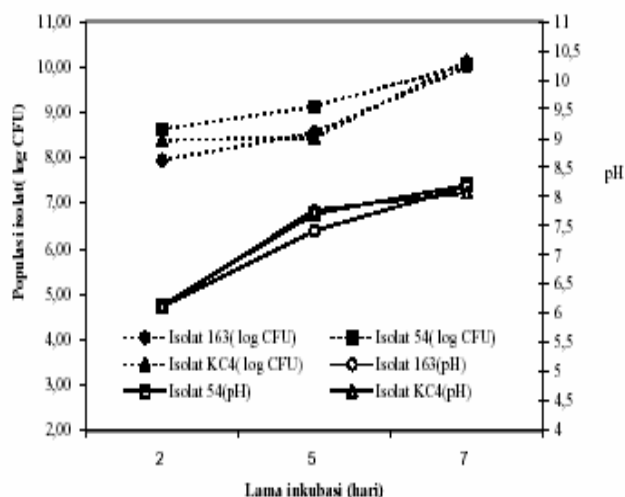


Gambar 3. Hasil uji daya hambat isolat terhadap pertumbuhan jamur *R. solani*. Foto diambil setelah inkubasi 3 hari. A. Penghambatan pertumbuhan jamur *R. solani* oleh isolat pada paper disc; B. Kontrol (pertumbuhan jamur *R. solani* tanpa kultur isolat).

diduga melalui mekanisme antibiosis. Nishijima *et al.* (2005) mengatakan bahwa spesies *Bacillus* menghasilkan sedikitnya 66 jenis antibiotik dan strain tertentu dari *Bacillus* merupakan agen biokontrol. Tiga isolat yang memiliki daya hambat terbesar terhadap pertumbuhan jamur *R. solani*, selanjutnya diidentifikasi di Laboratorium Bakteriologi, Balai Penelitian Veteriner (Balitvet), Bogor. Hasilnya menunjukkan bahwa isolat 5₄ dan 16₃ adalah *Bacillus pantotheinticus* dan isolat KC₄ adalah *Bacillus brevis*.

Jumlah populasi dan nilai pH pada medium produksi

Hasil pengukuran pH dan penghitungan jumlah bakteri pada hari ke 2, 5 dan 7 dapat dilihat pada Gambar 5. Nilai pH naik dari sekitar 6 pada hari ke dua inkubasi menjadi lebih dari 8 pada hari ke tujuh masa inkubasi. Naiknya nilai pH adalah karena isolat menghasilkan metabolit sekunder seperti iturin dan surfaktin yang dibuktikan dengan kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan *R. solani* (Gambar 4) dan terbentuknya misel oleh surfaktin yang dihasilkan isolat, yang dicirikan dengan adanya *clearing zone* pada Gambar 6.



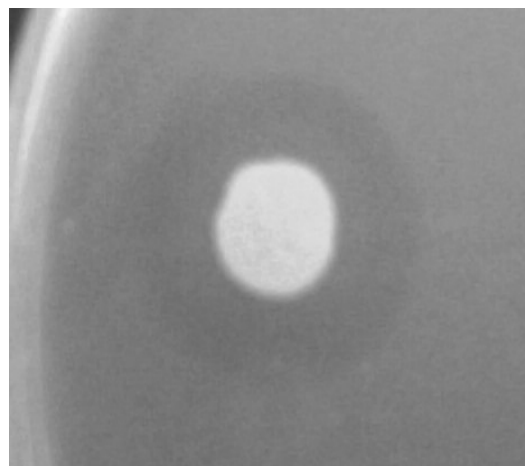
Gambar 5. Populasi dan nilai pH isolat.

Hasil penghitungan jumlah bakteri menunjukkan bahwa pada hari ke-2 hingga hari ke-7 jumlah bakteri mengalami kenaikan. Pertumbuhan mikroba penghasil antibiotik dan produksinya tergantung pada komposisi media, khususnya pada sumber karbon dan nitrogen serta kondisi fermentasi (Theobald *et al.*, 2000). Jumlah bakteri yang semakin banyak akan menghasilkan jumlah metabolit sekunder yang semakin banyak pula, hal ini terlihat dari hasil percobaan yang menunjukkan daya hambat terbesar (95,67%) dihasilkan oleh isolat nomor 5₄ yang memiliki jumlah bakteri terbanyak (1195×10^6).

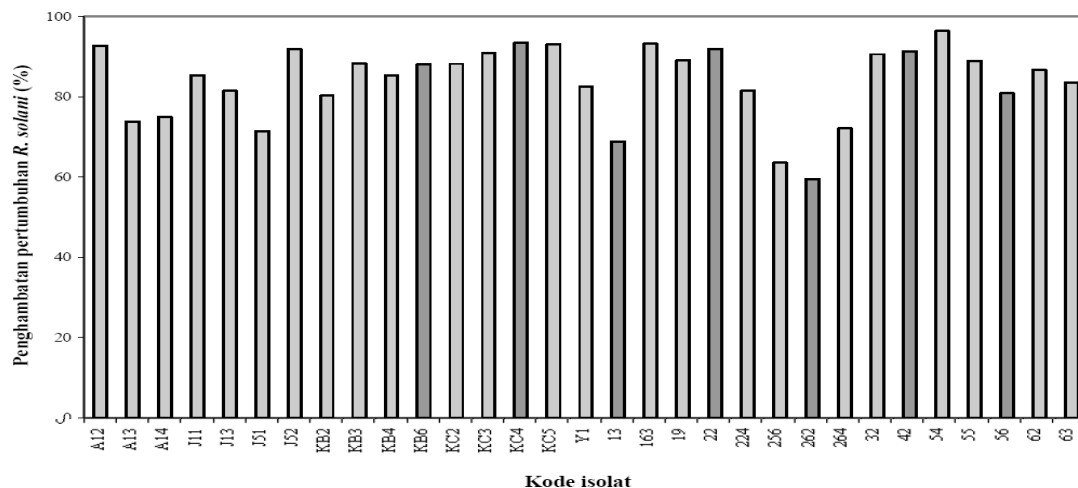
Uji aktivitas biosurfaktan

Prinsip uji aktivitas biosurfaktan adalah berdasarkan sifat surfaktan yang mampu membentuk misel mengelilingi komponen hidrofobik. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan surfaktan akan menimbulkan daerah halo di sekitarnya karena surfaktan yang dikeluarkan akan membentuk misel mengelilingi komponen hidrofobik, yang dalam penelitian ini adalah tributirin.

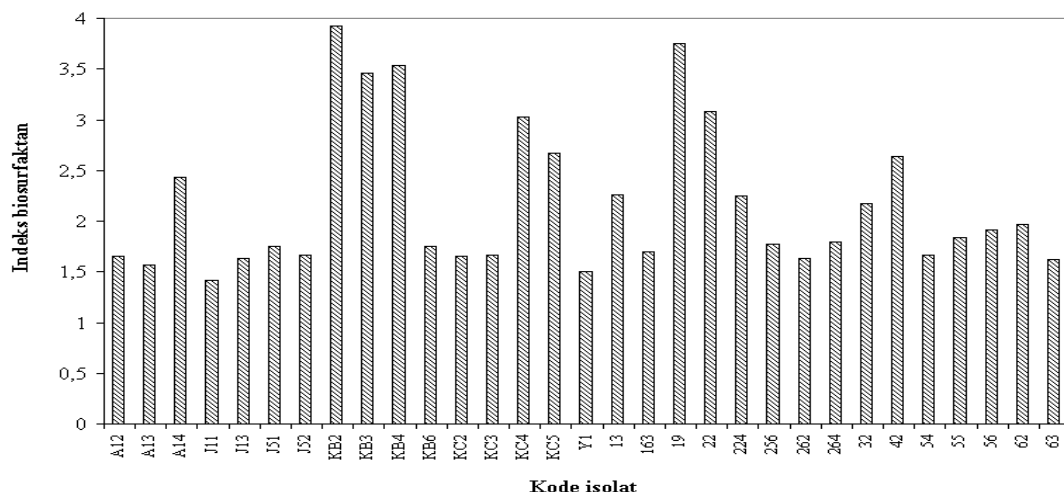
Hasil percobaan (Gambar 6 dan 7) menunjukkan bahwa semua isolat bakteri mampu menghasilkan surfaktan dengan indeks biosurfaktan yang berbeda-beda, berkisar antara 1 hingga 3,9. Isolat yang memiliki indeks biosurfaktan terbesar adalah isolat nomor KB₂ (3,92). Hasil ini menunjukkan bahwa isolat-isolat bakteri dalam kerjanya menghambat pertumbuhan jamur *R. solani* memproduksi sekaligus iturin dan surfaktin. Hal ini berarti semua isolat yang diuji adalah kooproduser iturin dan surfaktin. Genus *Bacillus*, umumnya merupakan kooproduser senyawa antibiotik polipeptida (Feignier *et al.*, 1996). Surfaktin seperti halnya iturin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri pada fase stasioner. Surfaktin dapat berperan sebagai anti jamur dengan cara membentuk misel dengan komponen membran sel jamur.



Gambar 6. Hasil uji aktivitas biosurfaktan setelah inkubasi 2 hari. Daerah halo yang terbentuk disekitar isolat menunjukkan terjadinya interaksi antara tributirin dan surfaktin.



Gambar 4. Persentase penghambatan pertumbuhan *R. solani* oleh 31 isolat-isolat bakteri.



Gambar 7. Indeks biosurfaktan dari 31 isolat.

KESIMPULAN

Dari hasil skrining terhadap 31 isolat bakteri, didapatkan dua species *Bacillus* yang berpotensi untuk agen biokontrol *Rhizotonia solani* yaitu *B. pantotheinticus* (Isolat 5₄ dan 16₃) dan *B. brevis* (Isolat KC₄), dengan daya hambat terbesar sekitar 93-96%. Semua isolat yang diuji adalah kooproduser iturin dan surfaktin. Indeks surfaktin terbesar (3,91) dihasilkan oleh *Bacillus* sp (isolat KB2).

DAFTAR PUSTAKA

- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (11): 4081-4085
- Feignier, C., F. Besson, and G. Michel. 1996. Characterization of iturin synthetase in the wild-type *Bacillus subtilis* strain producing iturin and an iturin deficient mutant. *FEMS Microbiology Letters* 136: 117-122.
- Gasoni, L., J. Cozzi, K. Kobayashi, V. Yossen, G. Zumelzu, and S. Babbitt. 1998. Suppressive effect of antagonistic agent on *Rhizoctonia* isolates on lettuce and potato in Argentina field plots. In: *International Congress of Plant Pathology*. Edinburgh, Scotland, 9-16 August 1998.
- Huang, C.H., T. Ano, and M. Shoda. 1993. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76: 445-450.
- Lin, A., T.M. Lee, and J.C. Rern. 1994. Tricholin, a new antifungal agent from *Trichoderma viridie* and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Journal of Antibiotics* 47 (7): 799-805.
- Nishijima, T., K. Toyota, and M. Mochizuki. 2005. Predominant culturable *Bacillus* species in Japanese arable soils and their potential as biocontrol agents. *Microbes and Environments* 20 (1): 61-68.
- Shaw, I., E. Burke, F. Suharyanto, and G. Sihombing. 2000. Residues of p,p'-DDT and hexachlorobenzene in human milk from Indonesian women. *Environmental Science and Pollution Research* 7 (2): 75-77.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (6): 515-521
- Sneh, B., B. Lee, and O. Akira. 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. St. Paul, USA: The American Phytopathological Society.
- Theobald, U., J. Schimana, and H. Fielder. 2000. Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tu6040. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 307-313.
- Yu, G.Y., J.B. Sinclair, G.L. Hartman, and B.L. Bertagnolli. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 955-963.
- Yuliar. 2002. Study on medium compositions to enhance iturin a productivity by *Bacillus subtilis* RB14-CS. [Master Thesis]. Tokyo: The Graduate School of Tokyo Institute of Technology.