



## **BAKTERI ENDOFIT YANG DIISOLASI DARI AKAR *Eurycoma longifolia* DAN POTENSINYA SEBAGAI PENGENDALI JAMUR PATOGEN TANAMAN**

### **Endophytic Bacteria Isolated from the Root of *Eurycoma longifolia* and Its Potential as Biocontrol Agent of Plant Pathogenic Fungi**

Tri Ratna Sulistiyani<sup>1\*</sup>, Siti Meliah<sup>1</sup>, Damayanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Jawa Barat, Indonesia.

<sup>2</sup>Universitas Tadulako, Jl. Soekarno Hatta KM. 9, Tondo, Mantikulore, Kota Palu, Sulawesi Tengah 94148

\*Email: [trilisty01@gmail.com](mailto:trilisty01@gmail.com)

#### **ABSTRACT**

*Eurycoma longifolia* (pasak bumi) is known as a medicinal plant that contains biologically active compounds. Studies on endophytic bacteria associated with pasak bumi and their biocontrol activities have not been widely reported. The objective of this study is to isolate potential endophytic bacteria associated with *E. longifolia* possessing biocontrol activity against plant pathogenic fungi, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, and *Colletotrichum gloeosporioides*. Endophytic bacteria were isolated from the roots of *E. longifolia* using the plant piece method and identified based on 16S rRNA genes analysis. Antagonist test of bacterial isolates was conducted by dual confrontation method. The mechanisms of fungal growth inhibition were evaluated based on their ability to produce hydrolytic enzymes, antibiotic, and volatile organic compounds. Two isolates were obtained and identified as *Stenotrophomonas maltophilia* (Apb1) and *Serratia marcescens* (Apb2). Apb2 was able to inhibit the growth of four tested fungi and showed protease, chitinase as well as cellulase activities. The crude extract and volatile organic compound produced by Apb2 were active against *F. solani* growth.

**Keywords:** biocontrol, endophytic, *Eurycoma longifolia*, fungi, inhibition mechanism

#### **ABSTRAK**

*Eurycoma longifolia* (pasak bumi) dikenal sebagai tanaman obat yang mengandung beberapa senyawa aktif secara biologis. Penelitian mengenai bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman pasak bumi berikut aktivitas biokontrolnya belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri endofit potensial dari tanaman *E. longifolia* yang memiliki aktivitas biokontrol terhadap empat strain uji jamur patogen tanaman, yaitu *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, dan *Colletotrichum gloeosporioides*. Bakteri endofit diisolasi dari akar *E. longifolia* menggunakan metode *plant piece* dan diidentifikasi berdasarkan analisis gen 16S rRNA. Uji antagonis isolat bakteri dilakukan dengan metode konfrontasi ganda. Mekanisme penghambatan jamur patogen tanaman dievaluasi berdasarkan kemampuannya dalam memproduksi enzim hidrolisis, senyawa antibiotik, dan senyawa organik volatil. Dua isolat bakteri endofit berhasil diperoleh dan teridentifikasi sebagai *Stenotrophomonas maltophilia* (Apb1) dan *Serratia marcescens* (Apb2). Isolat Apb2 mampu menghambat pertumbuhan keempat jamur yang diuji dan menunjukkan aktivitas protease, kitinase dan selulase. Ekstrak kasar dan senyawa organik volatil yang dihasilkan oleh isolat Apb2 aktif menghambat pertumbuhan *F. solani*.

**Kata Kunci:** biokontrol, endofit, *Eurycoma longifolia*, jamur, mekanisme penghambatan

## PENDAHULUAN

*Eurycoma longifolia* atau yang biasa dikenal masyarakat dengan sebutan 'pasak bumi' merupakan tanaman kaya senyawa aktif dan saat ini banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, baik medis maupun tradisional. Hasil penelitian Chua et al. (2011) menyatakan bahwa lebih dari 85 senyawa telah ditemukan pada tanaman pasak bumi, dengan konsentrasi tertinggi adalah kuasinoid terutama eurycomanon dan turunannya. Bahan aktif tersebut dapat ditemukan pada seluruh bagian tanaman dengan kadar yang bervariasi. Khanam et al. (2015) dan Kuspradini et al. (2019) mengemukakan bahwa ekstrak tanaman pasak bumi menunjukkan aktivitas antimikrob. Senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman pasak bumi sebagian besar dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, walaupun senyawa canthin-6-one dan alkaloid  $\beta$ -carboline yang terkandung dapat digunakan sebagai insektisida pengusir serangga dan herbivora (Chua et al. 2011). Senyawa aktif yang dihasilkan diperkirakan sebagai hasil interaksi antara tanaman dan mikroba yang berasosiasi dengan tanaman tersebut.

Bakteri yang tumbuh dan menghabiskan minimal satu siklus hidupnya di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan efek negatif pada tanaman disebut endofit (Pimentel et al. 2011). Bakteri ini hidup secara simbiosis mutualisme dengan tanaman inang (Wani et al. 2015). Saat ini keberadaan mikroba endofit belum dipelajari secara menyeluruh pada semua jenis tanaman, namun minimal satu jenis mikroba endofit akan berasosiasi dengan tanaman tersebut (Miller et al. 2012, Alvin et al. 2014, Das et al. 2017). Asosiasi yang terjadi membuat bakteri endofit mampu mensintesis senyawa aktif yang relatif sama dengan yang disintesis oleh tanaman inangnya. Dengan melakukan eksplorasi bakteri endofit dari tanaman pasak bumi, diharapkan diperoleh bakteri endofit jenis baru yang membawa karakter tanaman pasak bumi yaitu penghasil senyawa aktif antimikrob.

Bakteri endofit memiliki kemampuan dalam meningkatkan induksi resistensi terhadap patogen tanaman dan

menghasilkan senyawa aktif untuk melawan mikroba yang menginfeksi tanaman (Malinda et al. 2015). Bakteri endofit juga mampu meningkatkan resistensi tanaman terhadap stres biotik dan abiotik, menghasilkan hormon perangsang pertumbuhan tanaman, menghasilkan enzim, dan mampu menambat nitrogen bebas (Sulistiyani dan Lisdiyanti 2016). Kemampuannya yang beragam tersebut menyebabkan bakteri endofit dimanfaatkan dalam bioteknologi pertanian (Lacava dan Azevedo 2013).

*Sclerotium rolfsii* merupakan salah satu jamur patogen yang menyebabkan penyakit pada tanaman, dengan ciri-ciri busuk batang, layu, rebah kecambah, dan jamur ini menyerang tanaman kacang tanah, kentang, tomat, kedelai, kubis-kubisan, bawang, seledri, jagung, selada, kapas, tembakau dan tanaman dari famili Cucurbitaceae (Agrios 1997 dalam Magenda et al. (2011). *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan jamur pascapanen penyebab antraknosa dan menyerang buah-buah tropis seperti mangga, pepaya, alpukat, dan buah naga (Siddiqui dan Ali 2014). Hampir sama dengan jamur patogen tanaman lainnya, genus *Fusarium* menginfeksi beberapa bagian tertentu dari tanaman seperti biji-bijian, bibit, pucuk, akar, batang dan berakibat menurunkan kualitas produk hasil panen. Adanya resistensi patogen tanaman terhadap insektisida yang ada dan penggunaan insektisida yang tidak sesuai aturan menyebabkan diperlukan pencarian mikroba jenis baru yang mampu mengendalikan pertumbuhan patogen tanaman. Pencarian agen pengendali hayati yang ramah lingkungan dapat dilakukan dengan melakukan isolasi dan menapis bakteri endofit asal tanaman pasak bumi yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa bioaktif antimikrob pengendali jamur patogen tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri endofit potensial dari tanaman pasak bumi yang memiliki aktivitas biokontrol terhadap empat strain uji jamur patogen tanaman, yaitu *S. rolfsii*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* dan pada akhirnya dapat diaplikasikan dalam bidang pertanian.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biosistematika dan Kultur Koleksi Mikrob, Pusat Penelitian Biologi-LIPI pada Tahun 2017.

### Sampel tanaman

Akar tanaman *E. longifolia* liar dikoleksi dari Pulau Karimun Kecil (E 103° 23' 39,8" N 1° 8' 17,9"), Kepulauan Riau, Indonesia, pada ketinggian 102 mdpl. Sampel akar disimpan dalam amplop kertas dan dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakteri endofitnya. Sampel akar diidentifikasi berdasarkan pendekatan morfologi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

### Sterilisasi permukaan akar

Sampel akar tanaman pasak bumi dibersihkan dari kotoran menggunakan air mengalir selama 5–10 menit. Sampel akar kemudian dipotong menjadi ukuran kecil dan disterilisasi menggunakan beberapa larutan, dengan tahapan larutan etanol 70% selama 3 menit, larutan sodium hipoklorit 3% selama 5 menit, dan larutan etanol 70% selama 30 detik. Sampel dibilas tiga kali menggunakan akuades steril dengan masing-masing pembilasan selama 2 menit. Sampel selanjutnya dikeringkan menggunakan tisu steril. Keberhasilan proses sterilisasi permukaan dicek dengan menyebarkan 100 µL akuades bilasan terakhir pada permukaan media *Reasoner's 2A agar* (R2A, 1/10 konsentrasi semula) yang telah ditambah dengan *cycloheximide* 50 ppm. Sterilisasi permukaan dikatakan berhasil apabila tidak ada mikrob yang tumbuh pada media.

### Isolasi bakteri endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan menggunakan metode *plant piece*. Akar yang telah steril dipotong dan diletakkan di atas permukaan media R2A agar (1/10 konsentrasi awal) yang telah ditambah *cycloheximide* 50 ppm. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 2–15 hari. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media R2A yang baru untuk selanjutnya dimurnikan sampai

diperoleh koloni tunggal. Koloni bakteri murni diamati berdasarkan karakter fenotifnya (warna, tepian, permukaan, reaksi Gram menggunakan uji KOH) dan disimpan menggunakan gliserol 10% pada –80°C.

### Ekstraksi DNA dan amplifikasi 16S rDNA

Ekstraksi dan amplifikasi DNA mengacu pada metode koloni PCR (Packeiser et al. 2013). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan sepasang primer 27F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991). Reagen yang digunakan dalam amplifikasi 16S rDNA antara lain GoTaq Green Master Mix, primer 27F dan 1492R, dimethyl sulfoxide (DMSO), cetakan DNA, dan *ultrapure water* dengan volume total 25 µL. Program kondisi PCR sebagai berikut: *initial denaturation* suhu 95°C selama 90 detik, diikuti dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi suhu 95°C, selama 30 detik; *annealing* suhu 50°C, selama 30 detik; *elongasi* suhu 72°C, selama 90 detik, *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit, dan terakhir suhu 4°C selama 20 menit. Keberhasilan amplifikasi PCR dicek menggunakan gel agarosa 1%. Gel agarosa kemudian direndam dalam larutan etidium bromida (5 mg mL<sup>-1</sup>) selama 30 menit. Visualisasi produk PCR diamati menggunakan alat UV transilluminator.

### Sekuensing DNA dan analisis filogenetik

Sekuensing DNA teramplifikasi menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) (Applied Biosystems) dengan sepasang primer 27F dan 1492R. Data hasil sekuensing diolah menggunakan program ChromasPro dan homologi sekuen dicari melalui website EzTaxon secara online (<http://www.ezbiocloud.net>) (Yoon et al. 2017). Pohon filogenetik dibuat dengan metode Neighbor-Joining tree (NJT) yang terimplementasi dalam program MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) menggunakan sekuen referensi yang diperoleh dari bank data GeneBank/DDBJ/EMBL secara online. Model K2+G+I (Kimura 3-parameter) dan *Gamma distributed* dipilih sebagai model terbaik untuk analisis pohon filogenetik dengan *bootstrap* 1000 ulangan.

### Uji antagonis antijamur

Isolat bakteri endofit diuji kemampuannya sebagai agen biokontrol penghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman. Jamur patogen tanaman uji merupakan koleksi Indonesian Culture Collection (InaCC) antara lain *S. rolfsii* InaCC F5, *F. solani* InaCC F76, *F. oxysporum* InaCC F78, *C. gloeosporioides* InaCC F264. Aktivitas biokontrol diuji pada media *malt extract agar* (MEA) dengan metode konfrontasi ganda. Bakteri endofit dan jamur uji diinokulasikan pada cawan petri yang sama, dimana jamur uji diinokulasikan tepat di bagian tengah media, sedangkan bakteri endofit ditempatkan di kedua sisi jamur yang telah ditumbuhkan satu hari sebelumnya. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama lima hari. Masing-masing uji dibuat dalam dua ulangan. Pada hari kelima dihitung persentase daya hambatnya dengan rumus:

$$R = (R_c - R_i) / (R_c) \times 100\%$$

Keterangan:

- R : Persentase daya hambat (%)  
R<sub>c</sub> : Jari-jari koloni jamur pada kontrol (mm)  
R<sub>i</sub> : Jari-jari koloni jamur menuju pusat antagonis (mm)  
(Narayanansamy 2013).

### Aktivitas enzim bakteri endofit

Isolat bakteri endofit akar tanaman pasak bumi dievaluasi potensinya dalam menghasilkan enzim hidrolisis protease, kitinase, dan selulase. Bakteri endofit ditumbuhkan pada media *nutrient agar* (NA) selama 24 jam pada suhu 28°C untuk digunakan pada uji aktivitas enzim. Uji aktivitas protease dilakukan dengan menginokulasikan bakteri endofit pada media selektif *modified basal medium* (MM) yang mengandung 1 g glukosa, 2,5 g *yeast extract*, 16 g *bacto agar*, 6,2 g susu skim dan akuades 1000 mL. Media selektif yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Pada jam ke-24 diamati dan dihitung zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Index enzimatik merupakan rasio antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri endofit (Castro et al. 2014).

Uji aktivitas kitinase dilakukan dengan menginokulasikan bakteri endofit pada media MM yang mengandung 2% koloidal kitin dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam. Diamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dan dihitung indek enzimatifnya (Castro et al. 2014).

Uji aktivitas selulase, isolat bakteri endofit diinokulasikan pada media MM yang mengandung 1% *carboxymethyl cellulose* (CMC) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C. Pada jam ke-48, media diwarnai dengan *Congo red* 1% dan dibilas dengan buffer fosfat. Adanya zona berwarna kuning disekitar koloni dengan diameter 8 mm atau lebih menunjukkan bahwa bakteri endofit memiliki aktivitas selulase.

### Produksi ekstrak kasar bakteri terpilih

Satu ose penuh bakteri endofit yang sebelumnya mampu menghambat pertumbuhan jamur uji diinokulasikan ke dalam 25 mL media *nutrient broth* (NB) dan diinkubasi pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 120 rpm suhu 28°C selama lima hari. Kultur dipanen pada hari kelima dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, selama 15 menit, suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh selanjutnya diekstrak menggunakan pelarut organik etil asetat (Arunachalam dan Gayathri 2010) dengan perbandingan yang sama antara supernatan dan etil asetat (1:1) dan dilakukan 3x pengulangan. Fase etil asetat dipisahkan dan digunakan untuk uji selanjutnya.

### Uji aktivitas ekstrak senyawa antijamur

Ekstrak kasar bakteri endofit terpilih sebanyak 30 µL diteteskan pada *disc blank* steril dan dibiarkan sampai etil asetat menguap. *Disc blank* Selanjutnya diletakkan di bagian pinggir cawan petri berisi media MEA yang telah diinokulasi oleh jamur uji satu hari sebelumnya. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama lima hari. Masing-masing uji dibuat dalam dua ulangan. Etil asetat digunakan sebagai kontrol negatif.

### Uji senyawa antijamur volatil

Bakteri endofit terpilih digores secara merata pada permukaan media NA, sedangkan jamur uji ditumbuhkan tepat di bagian tengah cawan petri yang telah berisi media *potato dextrose agar* (PDA). Setelah bakteri tumbuh optimal, kedua cawan petri

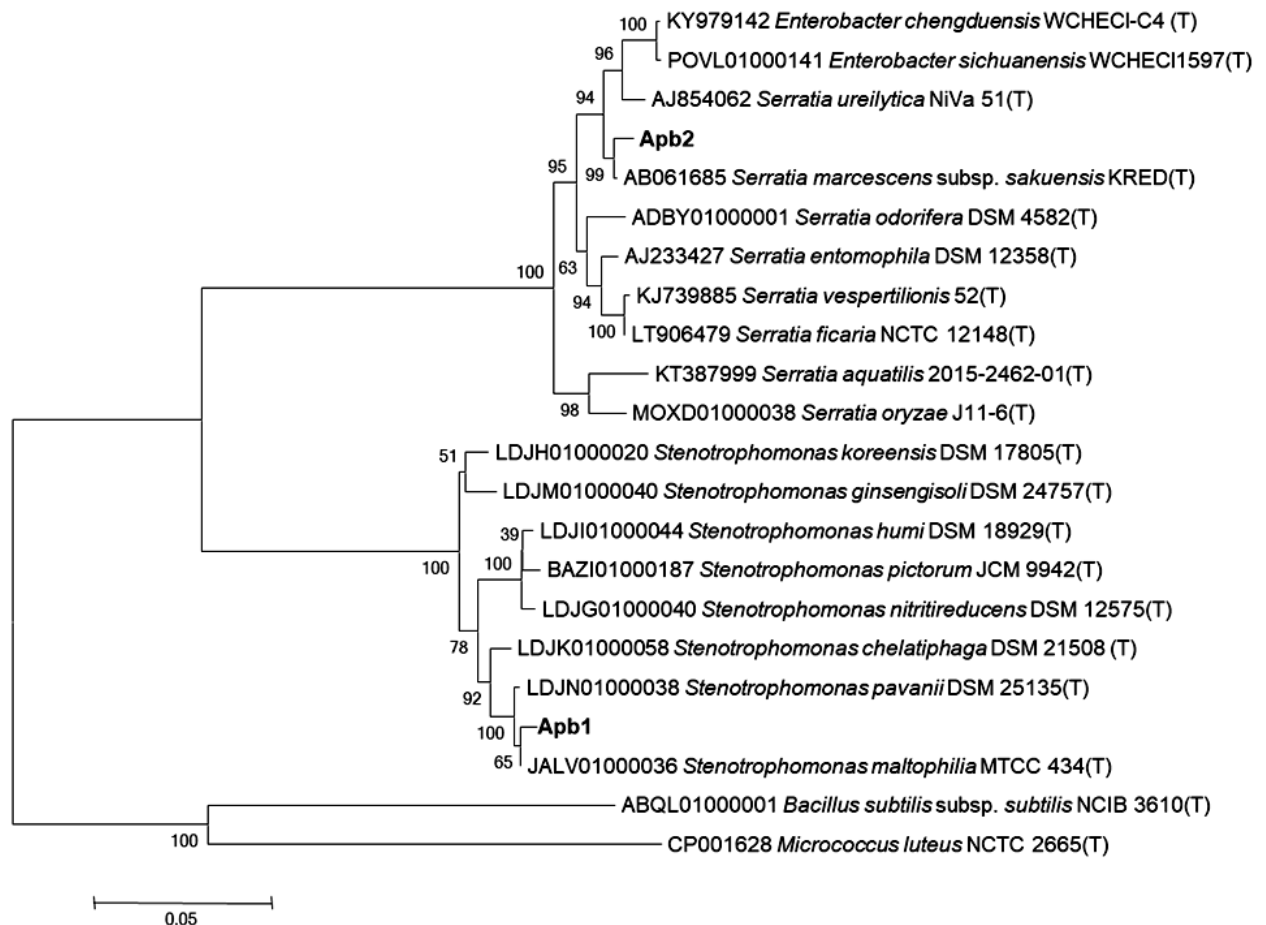
diletakkan secara berhadapan dan ditutup rapat menggunakan selotip dan diinkubasi pada suhu 28°C selama lima hari. Kontrol negatif berupa cawan petri yang ditumbuhi jamur uji dan diletakkan terbalik menutupi cawan petri yang berisi medium NA (Dennis dan Webster 1971). Diamati pertumbuhan jamur patogen selama masa inkubasi.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tanaman pasak bumi sama halnya dengan tanaman lain, bahwa dalam satu tanaman minimal ada satu spesies mikrob endofit yang berasosiasi (Miller et al. 2012, Alvin et al. 2014, Das et al. 2017). Sebanyak dua isolat bakteri yang menunjukkan karakter berbeda berhasil diisolasi dari akar tanaman pasak bumi asal Pulau Karimun Kecil, Kep. Riau. Isolasi dengan metode *plant piece* dan media R2A dengan komposisi media yang minimal menyebabkan sedikit bakteri yang berhasil diisolasi. Isolasi dengan metode *plant piece* dilakukan dengan meletakkan potongan akar pasak bumi dan hal ini

menyebabkan bakteri yang terdapat di dalam tumbuhan tidak terdispersi keluar dari potongan sampel tersebut. Berbeda halnya dengan penggunaan metode *spread plate*, dimana sampel dihancurkan terlebih dahulu sehingga bakteri yang terdapat di dalam sampel akan terdispersi di media (Sulistiyani et al. 2014). Penggunaan media dengan komposisi dan kadar yang minimal bertujuan untuk meminimalisasi bakteri dengan pertumbuhan yang cepat, dengan harapan dapat diperoleh bakteri jenis baru. Berdasarkan pengamatan morfologi dan uji KOH, kedua isolat merupakan bakteri Gram negatif, dengan koloni berwarna putih (*milky*), berbentuk bulat, tepian rata, elevasi cembung, mengkilap, dan tidak tembus cahaya.

Identifikasi isolat berdasarkan pendekatan molekuler menggunakan primer universal 27F dan 1492R, diperoleh daerah teramplifikasi 16S rDNA dengan panjang sekuen ~1500 bp. Hasil identifikasi menunjukkan isolat bakteri Apb1 memiliki tingkat kesamaan dengan strain referensi



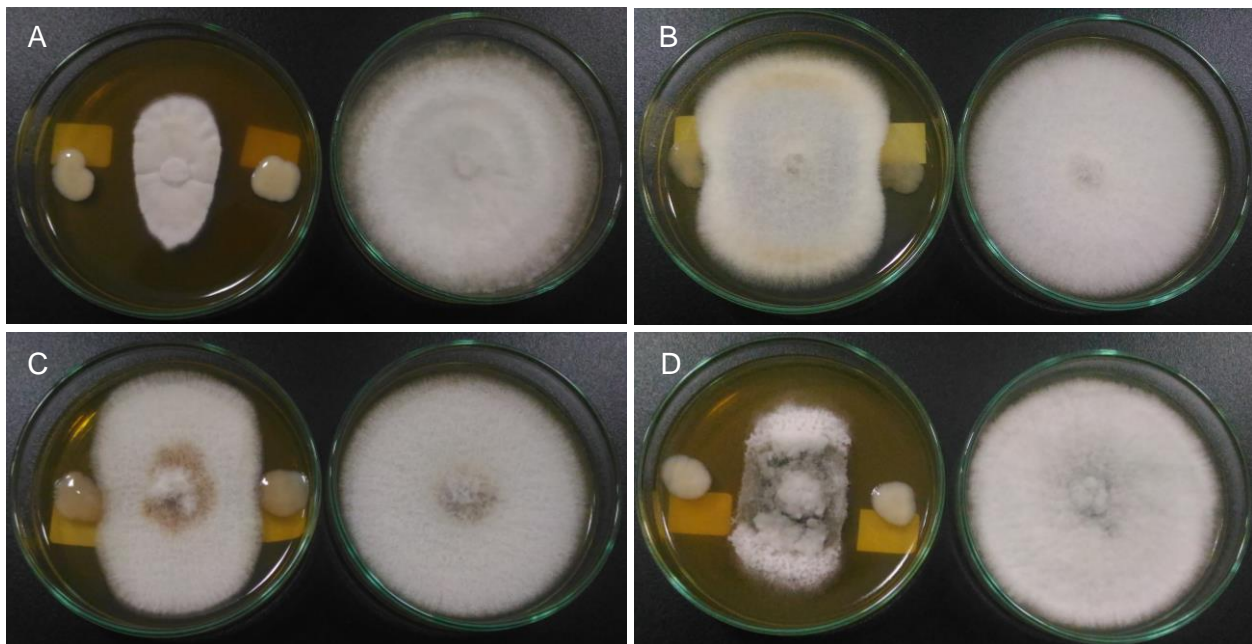
**Gambar 1.** Pohon filogenetik bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman pasak bumi menggunakan metode Neighbor-Joining, model Kimura 2-parameter dan distribusi Gamma dengan 1000 pengulangan

*Stenotrophomonas maltophilia* sebesar 99% dan isolat Apb2 memiliki persentase kesamaan dengan strain referensi *Serratia marcescens* sebesar 99,34%. Kedua bakteri tersebut termasuk dalam filum proteobacteria, kelas Gammaproteobacteria (Gambar 1). *S. maltophilia* merupakan jenis bakteri yang sering ditemukan sebagai bakteri endofit dan berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman (Wozniak et al. 2019) begitu juga dengan *S. marcescens* yang diisolasi dari tanaman *Achyranthes aspera* L. (Devi et al. 2016). *S. marcescens* Apb2 merupakan strain yang tidak memproduksi pigmen prodigiosin penyebab warna merah. Hardjito et al. (2002) menyatakan bahwa terdapat dua tipe *S. marcescens* yaitu berpigmen (merah) dan tidak berpigmen (putih). Pigmen merah prodigiosin dari *S. marcescens* telah dilaporkan memiliki karakteristik sebagai antimikrob (de Araújo et al. 2010).

Pulau Karimun Kecil merupakan bagian dari gugusan Pulau Karimun Besar yang umumnya terdiri dari batuan (*bedrock*) dan

bervegetasi tumbuhan liar (semak). Vegetasi yang menonjol adalah pohon kelapa dan *mangrove*. Kondisi geografis yang kering dan tidak banyak jenis tumbuhan, menyebabkan rendahnya keragaman bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman pasak bumi. Keragaman mikrob endofit dalam tanaman sangat dipengaruhi tingkat keragaman tanaman di sekitarnya. Semakin beragam tanaman di sekitar, semakin beragam pula mikrob endofit yang berasosiasi dengan tanaman tersebut (Sulistiyani et al. 2014).

Bakteri endofit banyak dimanfaatkan dalam bidang pertanian, diantaranya karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati (Suciatmih et al. 2014, Malinda et al. 2015). Hasil uji antagonis antijamur menunjukkan bahwa dari dua bakteri, *S. marcescens* Apb2 mampu menghambat pertumbuhan jamur uji koleksi InaCC *S. rolfsii*, *F. solani*, *F. oxysporum*, dan *C. gloeosporioides* (Gambar 2). Hasil uji dapat digunakan sebagai dasar pemanfaatan *S. marcescens* Apb2 sebagai



**Gambar 2.** Penghambatan pertumbuhan jamur uji *S. rolfsii* InaCC F5 (A), *F. solani* InaCC F76 (B), *F. oxysporum* InaCC 78 (C), dan *C. gloeosporioides* InaCC 264 (D) oleh isolat Apb2

**Tabel 1.** Indeks penghambatan pertumbuhan jamur patogen tumbuhan oleh isolat Apb2 *S. marcescens*

Jamur Uji	Indeks Penghambatan Terhadap Jamur Uji (%)
<i>S. rolfsii</i>	72,50
<i>F. solani</i>	37,50
<i>F. oxysporum</i>	42,50
<i>C. gloeosporioides</i>	60,00

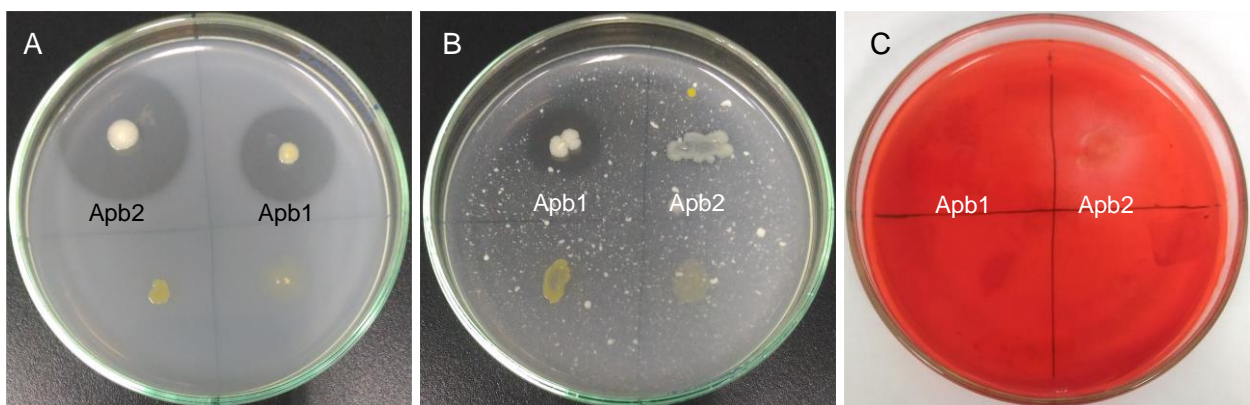
pengendali jamur patogen pada tanaman famili Cucurbitaceae dan tanaman buah-buahan tropis. Hong dan Park (2016) dalam kajiannya menyatakan *S. marcescens* merupakan salah satu bakteri endofit yang menghasilkan senyawa antimikroba dan antifungi. Penelitian Zhou et al. (2016) juga mengemukakan bahwa patogenitas antara *S. marcescens* berpigmen dan tidak berpigmen menunjukkan nilai LD50 yang hampir sama.

Data yang tersaji pada Tabel 1 menunjukkan bahwa *S. marcescens* Apb2 lebih aktif menghambat *S. rolfsii* dibandingkan *C. gloeosporioides*, *F. solani* dan *F. oxysporum*. Kekuatan penghambatan *S. marcescens* Apb2 terhadap jamur uji *S. rolfsii*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, dan *F. solani* berturut-turut sebesar 72,50%, 60,00%, 42,50%, dan 37,50%.

Pengendalian jamur patogen pada tanaman menggunakan agen hayati bakteri dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, antara lain produksi senyawa toksik (enzim hidrolisis, antibiotik, senyawa organik volatil), kompetisi tempat tumbuh dan nutrisi, mencegah kolonisasi patogen pada tanaman, dan menginduksi resistensi tanaman (Narayanamy 2013). Enzim dapat ditemukan pada setiap makhluk hidup, tak terkecuali mikrob. Setiap strain mikrob mampu menghasilkan sejumlah besar enzim hidrolisis dan oksidasi atau reduksi dalam sistem metabolismenya. Jumlah dan jenis enzim yang dihasilkan

setiap strain tidak selalu sama walaupun strain tersebut termasuk dalam spesies yang sama (Underkofler et al. 1957, Chow dan Ting 2015). Hal ini mendorong perlunya dilakukan eksplorasi bakteri yang mampu menghasilkan enzim tertentu dalam jumlah banyak.

Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan senyawa bioaktif enzim dapat diketahui melalui pendekatan kualitatif atau kuantitatif. Pendekatan kualitatif bertujuan untuk membuktikan keberadaan suatu enzim dalam sampel, dan data yang diperoleh adalah positif atau negatif berdasarkan perubahan warna media selektif yang digunakan. Sedangkan pendekatan kuantitatif bertujuan untuk menentukan jumlah enzim yang terdapat dalam sampel, dan harus menghasilkan data yang tepat (Biszwanger 2014). Hasil uji menunjukkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman pasak bumi mampu menghasilkan enzim protease, kitinase dan selulase. Hasil uji positif protease dan kitinase ditandai terbentuknya zona jernih di sekitar koloni, sedangkan uji positif selulase ditandai dengan terbentuknya zona berwarna kuning di sekitar koloni setelah penambahan larutan Congo Red. Perubahan warna mengindikasikan adanya aktivitas enzim dalam menghidrolisis polimer pati, kitin dan selulosa menjadi senyawa kimia yang lebih sederhana, sehingga lebih mudah dimanfaatkan oleh jamur.



**Gambar 3.** Hasil uji aktivitas enzim protease (A), kitinase(B), dan selulase (C) dari isolat *S. marcescens* Apb2

**Tabel 2.** Indeks aktivitas protease, kitinase, dan selulase bakteri endofit yang diisolasi dari akar pasak bumi

Kode Isolat	Identitas Terdekat Dengan Referensi	Indeks		
		Protease	Kitinase	Selulase
Apb1	<i>S. maltophilia</i>	7,20	0,85	-
Apb2	<i>S. marcescens</i>	7,20	5,45	5,20

Isolat Apb1 dan Apb2 memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan enzim, terlihat dari diameter zona jernih yang terbentuk (Gambar 3) dan indek aktivitas enzim terukur yang tersaji dalam Tabel 2. *S. maltophilia* Apb1 mampu menghasilkan protease dan kitinase, sedangkan *S. marcescens* Apb2 mampu menghasilkan tiga jenis enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan oleh *S. maltophilia* Apb1. Elhalag et al. (2016) mengemukakan bahwa *S. maltophilia* strain PD 4560 menunjukkan aktivitas proteolitik pada media *skim milk agar* dan Khursade et al. (2019) juga menyatakan bahwa *S. maltophilia* strain GD2 mampu menghasilkan protease yang berpotensi sebagai novel isolat untuk produksi enzim fibrinolitik. Hasil studi Purkayastha et al. (2018), *S. marcescens* strain ETR17 mampu menghasilkan beberapa enzim hidrolisis seperti kitinase, protease, lipase, selulase, IAA dan siderophore yang dapat dimanfaatkan dalam bioteknologi pertanian.

Secara umum komposisi kimia dinding sel jamur adalah homo dan heteropolisakarida, protein, protein-polisakarida kompleks, lipid, melanin, dan kitin (El-Enshasy 2007). Lebih tepatnya 50–60% glukukan, 20–30% glikoprotein, dan 10–20% kitin (Gow et al. 2017, Kang et al. 2018). Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim memiliki kaitan erat dengan



**Gambar 4.** Hasil uji penghambatan jamur uji *S. rolfsii* InaCC F5, menggunakan ekstrak *S. marcescens* Apb2

kemampuannya sebagai pengendali pertumbuhan jamur patogen tanaman. Ekspresi dan sekresi dari enzim lisis seperti kitinase, selulase, dan protease yang dihasilkan oleh bakteri dapat menghambat atau menekan aktivitas patogen dengan menghidrolisis beberapa senyawa polimer pada dinding sel jamur patogen tersebut. Apabila ditinjau dari indeks aktivitas enzim protease dan kitinase yang diperoleh dan dihubungkan dengan komposisi dinding sel jamur, diperkirakan bahwa mekanisme penghambatan pertumbuhan jamur uji terjadi melalui produksi senyawa enzim. *S. maltophilia* Apb1 mampu menghasilkan enzim protease dan kitinase, akan tetapi indeks aktivitas lebih kecil apabila dibandingkan dengan *S. marcescens* Apb2. Sehingga *S. maltophilia* Apb1 tidak mampu menghambat pertumbuhan jamur uji.

Mekanisme penghambatan patogen tanaman lainnya adalah produksi senyawa antibiotik dan senyawa organik volatil. Hasil pengujian menunjukkan bahwa senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh *S. marcescens* Apb2 hanya mampu menghambat pertumbuhan jamur uji *S. rolfsii* InaCC F5 (Gambar 4). Sedangkan melalui uji produksi senyawa volatil, hasil menunjukkan tidak ada jamur uji yang terhambat pertumbuhannya. Hal ini diperkirakan bahwa *S. marcescens* Apb2 tidak menghasilkan senyawa volatil yang mampu menghambat pertumbuhan jamur uji.

## KESIMPULAN

Bakteri endofit *S. maltophilia* Apb1 dan *S. marcescens* Apb2 yang diisolasi dari akar tanaman pasak bumi berpotensi sebagai sumber penghasil enzim dan antibiotik yang berpotensi dalam bidang pertanian maupun industri. *S. marcescens* Apb2 mampu mengendalikan pertumbuhan jamur patogen tanaman *S. rolfsii* dan *C. gloeosporioides*, *F. solani* dan *F. oxysporum*. Mekanisme yang digunakan oleh *S. marcescens* Apb2 dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman adalah melalui produksi enzim hidrolisis.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek DIPA Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) TA 2017.



Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdri. Mia Kusmiati dan Gita Azizah Putri atas bantuannya selama melakukan penelitian di laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alvin A, Miller KI, Neilan BA (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol Res* 169:483–495. doi: 10.1016/j.micres.2013.12.009
- Arunachalam C, Gayathri P (2010) Studies on bioprospecting of endophytic bacteria from the medicinal plant of *Andrographis paniculata* for their antimicrobial activity and antibiotic susceptibility pattern. *Int J Curr Pharm Res* 2:63–68
- Bisswanger H (2014) Review: Enzyme assays. *Perspect Sci* 1:41–55. doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005
- Castro RA, Quecine MC, Lacava PT, Batista BD, Luvizotto DM, Marcon J, Ferreira A, Melo IS, Azevedo JL (2014) Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *Springerplus* 3:382. doi: 10.1186/2193-1801-3-382
- Chow Y, Ting AS (2015) Endophytic l-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J Adv Res* 6:869–876. doi: 10.1016/j.jare.2014.07.005
- Chua LS, Moch Amin NA, Neo JCH, Lee TH, Lee CT, Sarmidi MR, Abdul Aziz R (2011) LC–MS/MS-based metabolites of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) in Malaysia (Perak and Pahang). *J Chromatogr B* 879:3909–3919. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.11.002
- Das I, Panda MK, Rath CC, Tayung K (2017) Bioactivities of bacterial endophytes isolated from leaf tissues of *Hyptis suaveolens* against some clinically significant pathogens. *J Appl Pharm Sci* 7:131–136. doi: 10.7324/JAPS.2017.70818
- de Araújo HW, Fukushima K, Takaki GM (2010) Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules* 15:6931–6940. doi: 10.3390/molecules15106931
- Dennis BC, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans Brit Mycol Soc* 57:25–39. doi: 10.1016/S0007-1536(71)80077-3
- Devi KA, Pandey P, Sharma GD (2016) Plant growth-promoting endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 enhances the growth of *Achyranthes aspera* L., a medicinal plant. *HAYATI J Biosci* 23:173–180. doi: 10.1016/j.hjb.2016.12.006
- El-Enshasy HA (2007) Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications. Chapter 9. Pp 225–261. In: Yang ST (Ed.) *Bioprocessing for Value-Added Products From Renewable Resources*. Elsevier, London. doi: 10.1016/B978-044452114-9/50010-4
- Elhalag KM, Messiha NAS, Emara HM, Abdallah SA (2016) Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions. *J Appl Microbiol* 120:1629–1645. doi: 10.1111/jam.13097
- Gow NAR, Latge JP, Munro CA (2017) The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiol Spectr* 5:1–25. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
- Hardjito L, Huq A, Colwell RR (2002) The influence of environmental conditions on the production of pigment by *Serratia marcescens*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 7:100–104
- Hong CE, Park JM (2016) Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. *Plant Biotechnol Rep* 10:353–357. doi: 10.1007/s11816-016-0423-6
- Kang X, Kirui A, Muszynski A, Widanage MCD, Chen A, Azadi P, Wang P, Mentink-Vigier F, Wang T (2018) Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat Commun* 9:2747. doi: 10.1038/s41467-018-05199-0
- Khanam Z, Wen CS, Bhat IUH (2015) Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). *J King Saud Univ Sci*

- 27:23–30. doi: 10.1016/j.jksus.2014.04.006
- Khursade PS, Galande SH, Krishna PS, Prakasham RS (2019) *Stenotrophomonas maltophilia* Gd2: A potential and novel isolate for fibrinolytic enzyme production. *Saud J Biol Sci* 26:1567–1575. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.10.014
- Kuspradini H, Silau S, Supartini S, Rosamah E (2019) Comparative antimicrobial studies on plant species known as 'Pasak Bumi': *Eurycoma longifolia* Jack., *Rennelia elliptica* Korth. and *Trivalvaria macrophylla* miq. *F1000Research* 8:301. doi: 10.12688/f1000research.16954.1
- Lacava PT, Azevedo JL (2013) Endophytic bacteria: A biotechnological potential in agrobiological system. Pp 1–44. In: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A (Eds.) *Bacteria in Agrobiological Crop Productivity*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-37241-4\_1
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Pp. 115–175. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (Eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York
- Magenda S, Kandou FEF, Umboh SD (2011) Karakteristik isolat jamur *Sclerotium rolfsii* dari tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* Linn.). *J Bios Logos* 1:1–7. doi: 10.35799/jbl.1.1.2011.369
- Malinda N, Soekarno BPW, Yuliani TS (2015) Penghambatan *Fusarium oxysporum* oleh kultur filtrat bakteri endofit dari tanaman kedelai secara *in vitro*. *J Fitopatol Indones* 11:196–204. doi: 10.14692/jfi.11.6.196
- Miller KI, Qing C, Sze DMY, Roufogalis BD, Neilan BA (2012) Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. *Microb Ecol* 64:431–449. doi: 10.1007/s00248-012-0044-8
- Narayanasamy P (2013) Mechanisms of action of bacterial biological control agents. Pp. 295–429. In: *Biological Management of Diseases of Crops*. Progress in Biological Control, Vol 15. Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-007-6380-7\_5
- Packeiser H, Lim C, Balagurunathan B, Wu J, Zhao H (2013) An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Appl Biochem Biotechnol* 169:695–700. doi: 10.1007/s12010-012-0043-8
- Pimentel MR, Molina G, Dionisio AP, Marostica Junior MR, Pastore M (2011) The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* 2011:576286. doi: 10.4061/2011/576286
- Purkayastha GD, Mangar P, Saha A, Saha D (2018) Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS One* 13:e0191761. doi: 10.1371/journal.pone.0191761
- Siddiqui Y, Ali A (2014) Chapter 11: *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). Pp. 337–372. In: Bautista-Banos S (Ed.) *Post Harvest Decay: Control Strategies*. Elsevier, Amsterdam
- Suciatmih, Antonius S, Hidayat I, Sulistiyani TR (2014) Isolasi, identifikasi dan evaluasi antagonisme terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) secara *in vitro* dari jamur endofit tanaman pisang. *Berita Biol* 13:71–83. doi: 10.14203/beritabiologi.v13i1.656
- Sulistiyani TR, Lisdiyanti P (2016) Keragaman bakteri endofit pada tanaman *Curcuma heyneana* dan potensinya dalam menambat nitrogen. *Widyariset* 2:106–117. doi: 10.14203/widyariset.2.2.2016.106-117
- Sulistiyani TR, Lisdiyanti P, Lestari Y (2014) Population and diversity of endophytic bacteria associated with medicinal plant *Curcuma zedoaria*. *Microbiol Indones* 8: 65–72. doi: 10.5454/mi.8.2.4
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Underkofler LA, Barton RR, Rennert SS (1957) Microbiological process report: Production of microbial enzymes and their applications. *Appl Microbiol* 6:212–221

- Wani ZA, Ashraf N, Mohiuddin T, Riyas-Ul-Hassan S (2015) Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2955–2965. doi: 10.1007/s00253-015-6487-3
- Wozniak M, Gałazka A, Tyskiewicz R, Jaroszek-Sciseł J (2019) Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the Biolog GEN III microPlate™ test. *Int J Mol Sci* 20:5283. doi: 10.3390/ijms20215283
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755
- Zhou W, Li J, Chen J, Liu X, Xiang T, Zhang L, Wan Y (2016) The red pigment prodigiosin is not an essential virulence factor in entomopathogenic *Serratia marcescens*. *J Invertebr Pathol* 136:92–94. doi: 10.1016/j.jip.2016.03.011