

Bakteri filosfer padi sebagai kandidat agen biokontrol terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) penyebab penyakit hawar daun bakteri

Phyllosphere bacteria as a candidate of biocontrol agents against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) causes bacterial blight disease

ANINDITA PRABAWATI*, ARI SUSILOWATI, SUGIYARTO

Program Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57 126, Jawa Tengah, Indonesia. Tel./fax.: +62-271-663375. *email: anindita.prabawati07@gmail.com

Manuskrip diterima: 19 November 2018. Revisi disetujui: 24 Desember 2018.

Abstrak. Prabawati A, Susilowati A, Sugiyarto. 2019. Bakteri filosfer padi sebagai kandidat agen biokontrol terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab penyakit hawar daun bakteri. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 5*: 256-262. Tanaman padi seringkali menghadapi ancaman penyakit hawar daun bakteri (HDB) yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Biokontrol merupakan alternatif pengendalian penyakit tanaman secara alami, salah satunya menggunakan organisme hidup. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, menskrining, mengidentifikasi serta mengetahui hubungan kekerabatan bakteri filosfer padi yang antagonis Xoo sebagai kandidat agen biokontrol penyakit HDB. Bakteri filosfer diisolasi dari wilayah pertanian Kabupaten Klaten, Sragen dan Kota Surakarta. Skrining Bakteri antagonis Xoo dengan metode *Plug Agar* dilaksanakan di Sub Laboratorium Biologi, FMIPA UNS, Surakarta. Bakteri antagonis diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi koloni, morfologi sel dan sekuensing gen penyandi 16S rRNA. Sekuensing dilaksanakan di 1st BASE, Singapura. Hasil sekuensing disejajarkan dengan database *GenBank* melalui program BLASTN pada situs NCBI. Hubungan kekerabatan dianalisis dengan pohon filogeni yang dibuat menggunakan program MEGA 7.0. Sebanyak 52 isolat bakteri filosfer berhasil diisolasi dari Kabupaten Klaten, Sragen dan Kota Surakarta. Tujuh bakteri memiliki aktivitas antagonis Xoo, dengan indeks penghambatan terbesar 3,99 dan terkecil 1,31. Bakteri antagonis teridentifikasi sebagai *Bacillus* OBA1, *Bacillus* OBA8, *Bacillus* OBA14, *Bacillus* OCA7, *Bacillus* ODA1, *Bacillus* OIA8 dan *Arthrobacter* OIA10. Pohon filogeni menunjukkan isolat berada dalam grup *Bacillus* dan *Arthrobacter*.

Kata kunci: Bakteri filosfer, biokontrol, Hawar Daun Bakteri, HDB, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Abstract. Prabawati A, Susilowati A, Sugiyarto. 2019. Phyllosphere bacteria as a candidate of biocontrol agents against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) causes bacterial blight disease. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 5*: 256-262. Rice production is often threatened by bacterial blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Biocontrol is one of alternative plant disease management. Living organism, such as microorganism, take a role as a biocontrol agent. The aims of this research were to isolate, to select, to identify and to know the relationship of phyllosphere bacteria against Xoo. The antagonist bacteria can be a candidate of biocontrol agent. Bacteria were isolated from paddy fields in Klaten, Sragen, and Surakarta. Screening process was done by plug agar method. The research was conducted at Laboratory of Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sebelas Maret State University, Surakarta. Selected bacteria identified by characterizing cell and colony morphology and 16S rRNA gene sequencing. Sequencing was done in 1st BASE, Singapore. Phylogenetic tree was made by MEGA 7.0. This research successfully collected 52 isolates, 7 of them had antagonist activity against Xoo. Antagonist bacteria were identified as *Bacillus* OBA1, *Bacillus* OBA8, *Bacillus* OBA14, *Bacillus* OCA7, *Bacillus* ODA1, *Bacillus* OIA8, and *Arthrobacter* OIA10. The phylogenetic tree showed that the bacteria were *Bacillus* and *Arthrobacter* groups.

Keywords: Phyllosphere bacteria, biocontrol, bacterial blight disease, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

PENDAHULUAN

Salah satu wilayah pertanian yang turut berkontribusi sebagai sentra produksi padi adalah eks-Karesidenan Surakarta, Jawa Tengah. Sayangnya, produksi padi menghadapi ancaman serangan penyakit. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) penyebab hawar daun bakteri

(HDB) merupakan salah satu penyakit yang mengancam produksi padi (Li et al. 2015; Wang et al. 2015).

Tindakan penanganan HDB dapat dilakukan dengan penggunaan agen hayati. Sayangnya, petani masih enggan menggunakan agen hayati karena hasilnya tidak signifikan jika dibandingkan bakterisida kimiawi (Mustikarini et al. 2014). Meskipun dapat bekerja cepat menangani penyakit

tanaman, bakterisida kimia berpotensi mengganggu ekosistem dan jaring-jaring makanan (Fukuoka 2012). Selain itu, residu bakterisida kimiawi dapat mengganggu kesehatan manusia (Ma et al. 2014; Hernández et al. 2012). Maka dari itu, pengendalian penyakit secara alami diperlukan untuk menjaga ekosistem dan kesehatan manusia (Fukuoka 2012).

Interaksi organisme patogen dengan antagonisnya terjadi secara alamiah dalam suatu habitat (Fukuoka 2012). Atas dasar pemikiran tersebut, maka agen hayati untuk mengendalikan Xoo penyebab penyakit HDB dicari dari habitat yang sama. Isolasi bakteri filosoffer sebagai kandidat agen hayati antagonis Xoo diperlukan dari persawah yang terjangkit HDB di Kabupaten Klaten, Kabupaten Sragen dan Kota Surakarta.

BAHAN DAN METODE

Study area

Sampel daun padi diperoleh dari area persawah di Kabupaten Klaten (Kecamatan Karangom dan Karangdowo), Kabupaten Sragen (Kecamatan Sidoharjo dan Masaran) dan Kota Surakarta (Kecamatan Laweyan). Pemilihan lokasi ini mengacu pada Peta Data Luas Serangan OPT Padi Wilayah Surakarta yang dikeluarkan oleh Laboratorium Pengamatan Hama dan Penyakit Tanaman (LPHT) wilayah Surakarta. Isolasi, skrining dan PCR bakteri filosoffer antagonis Xoo dilaksanakan di Laboratorium FMIPA sublab Biologi, Universitas Negeri Sebelas Maret (UNS) Surakarta. Sekuensing gen penyandi 16S rRNA dilaksanakan di 1st BASE, Singapura. Penelitian dilaksanakan bulan September 2015 sampai Juni 2016.

Procedures

Isolasi diawali dengan pengenceran berseri, dengan mengambil 0,1 ml suspensi, disebar pada media dengan metode cawan sebar (*spread-plate method*). Inkubasi dilakukan satu minggu pada suhu ruangan (suhu 25°-30°C) Uji antagonis dilakukan dengan metode plug agar. Kultur cair Xoo digores dengan *cotton bud* pada media NA lalu dilubangi dengan *cork boerer* steril, kemudian potongan agar dibuang. Lubang diisi dengan potongan agar yang ditumbuhi bakteri filosoffer dan diinkubasi satu minggu. Aktivitas antagonis ditandai dengan adanya zona penghambatan di sekitar plug (Hoa et al. 2014).

Pewarnaan gram dilakukan dengan meneteskan akuades pada gelas benda, kemudian satu ose isolat diratakan dalam akuades. Gelas benda difiksasi di atas bunsen, digenangi kristal violet satu menit lalu dibilas akuades. Gelas benda ditetesi iodine, didiamkan dua menit dan dibilas akuades. Gelas benda dibilas Alkohol 95% tetes demi tetes selama 30 detik. Gelas benda dibilas aquades dan digenangi safranin 30 detik lalu dibilas akuades (Nanjwade et al. 2010). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop.

Isolasi DNA genom dilakukan dengan kit Presto™ Mini gDNA Bacteria. Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA dari DNA genom hasil ekstraksi dilakukan menggunakan primer *forward* 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAA

GTC-3') dan primer *reverse* 1387r (5'-GGGCGGGTG TACAAGGC-3'). Elektroforesis horizontal dilakukan dengan agarose 1% yang direndam dalam buffer *Tris-base Acetic Acid* (TAE 1×) selama 60 menit, 85V, 300 mA. Produk hasil PCR disekuensing di 1st BASE, Singapura. Hasil sekuensing dianalisis untuk diidentifikasi kemiripannya dengan data *GenBank* di situs NCBI (www.ncbi.nih.gov).

Data analysis

Aktivitas antagonis ditandai dengan adanya zona penghambatan di sekitar plug. Bakteri gram-positif ditandai dengan sel warna ungu sedangkan gram-negatif berwarna merah (Talaro 2008). Gram bakteri juga dijustifikasi dengan ada tidaknya lender saat ditetesi KOH 3%. Identitas bakteri antagonis menurut Bosshard et al. (2003), merupakan spesies sama jika kemiripan $\geq 99\%$, mempunyai kesamaan genus jika kemiripan $\geq 95\%$ - $<99\%$, dan kesamaan famili jika kemiripan $<95\%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri filosoffer padi dari persawah Kabupaten Klaten, Sragen dan Kota Surakarta

Isolasi bakteri filosoffer padi di Kabupaten Klaten, Sragen dan Kota Surakarta, Provinsi Jawa Tengah menghasilkan 52, yakni 24 isolat dari Surakarta, 14 isolat dari Kabupaten Klaten dan 14 isolat dari Kabupaten Sragen. Karakter morfologi koloni bakteri filosoffer dari Kota Surakarta terdiri dari *filamentous* dan *circular* dengan warna koloni didominasi warna kuning dan putih.

Morfologi koloni isolat bakteri filosoffer dari Kabupaten Klaten didominasi oleh koloni berwarna putih dan tampak berkapur, bentuk koloni *circular* dan *filamentous*. Isolat dari Kabupaten Sragen memiliki morfologi koloni berbentuk *circular* dan *filamentous*. Karakter morfologi isolat dari Kota Surakarta, Kabupaten Klaten dan Kabupaten Sragen disajikan pada Tabel 1.

Bakteri filosoffer padi antagonis Xoo

Dari keseluruhan 52 isolat bakteri filosoffer padi, diperoleh tujuh isolat yang menunjukkan aktivitas antagonis Xoo melalui proses skrining dengan metode *plug agar*. Aktivitas antagonis Xoo dari ketujuh isolat bakteri filosoffer ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling *plug*. Zona bening dari ketujuh isolat bakteri filosoffer padi disajikan pada Gambar 1. Hasil pengukuran menunjukkan perbedaan diameter zona bening dari tujuh isolat. Diameter zona bening dan indeks penghambatan bakteri filosoffer padi antagonis Xoo disajikan pada Tabel 4.

Tabel tersebut menunjukkan bahwa isolat dengan daya hambat terbesar adalah isolat OIA8 dengan diameter zona bening 25,15 mm dan indeks penghambatan 3,99. Indeks penghambatan paling kecil yaitu pada isolat OBA1 yakni 1,31. Isolat OIA10 menghasilkan *halo* yang sangat luas dan konsisten, dengan diameter *halo* 41,00 mm dan indeks penghambatan 5,56.

Tabel 1. Karakter morfologi isolat bakteri filosfer padi dari Kota Surakarta, Kabupaten Klaten, dan Kabupaten Sragen

Kode isolat	Karakter morfologi koloni	
	Bentuk/form	Warna
Kota Surakarta		
OBA1	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
OBA2	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OBA3	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OBA4	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OBA5	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OBA6	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OBA7	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OBA8	<i>Circular</i>	Putih
OBA9	<i>Circular</i>	Putih kelabu
OBA10	<i>Circular</i>	Kuning transparan
OBA11	<i>Circular</i>	Kuning transparan
OBA12	<i>Filamentous</i>	Putih
OBA13	<i>Circular</i>	Putih
OBA14	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
OBA15	<i>Filamentous</i>	Putih
OBA16	<i>Circular</i>	Kuning
OBA17	<i>Circular</i>	Putih
OBA19	<i>Circular</i>	Kuning transparan
OBA20	<i>Circular</i>	Kuning transparan
OBA21	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
OBA22	<i>Punctiform</i>	Kuning
OBA23	<i>Filamentous</i>	Putih
OBA24	<i>Filamentous</i>	Putih
OBA25	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
Kabupaten Klaten		
OCA1	<i>Circular</i>	Putih kapur
OCA2	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
OCA3	<i>Circular</i>	Kuning mengkilap
OCA4	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
OCA5	<i>Circular</i>	Putih kapur
OCA6	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
OCA7	<i>Circular</i>	Kuning
ODA1	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
ODA2	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
ODA3	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
ODA4	<i>Filamentous</i>	Putih kapur
ODA5	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
ODA6	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
ODA7	<i>Circular</i>	Kuning transparan
Kabupaten Sragen		
OIA1	<i>Circular</i>	Oranye
OIA2	<i>Circular</i>	Putih kapur
OIA3	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
OIA4	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
OIA5	<i>Circular</i>	Putih kelabu
OIA6	<i>Circular</i>	Kuning transparan
OIA7	<i>Circular</i>	Kuning
OIA8	<i>Circular</i>	Putih kapur
OIA9	<i>Circular</i>	Kuning
OIA10	<i>Circular</i>	Kuning
OJA1	<i>Filamentous</i>	Putih kelabu
OJA2	<i>Circular</i>	Oranye
OJA3	<i>Filamentous</i>	Kuning transparan
OJA5	<i>Circular</i>	Putih kelabu

Tabel 4. Zona bening dan indeks penghambatan bakteri filosfer antagonis Xoo

Isolat	Diameter zona bening ¹ (mm)	Indeks penghambatan
	OBA1	
OBA8	15,08	1,89
OBA14	16,55	2,63
OCA7	13,90	2,21
ODA1	14,22	2,26
OIA8	25,12	3,99
OIA10	41,00	5,56

Tabel 5. Karakter morfologi sel bakteri filosfer antagonis Xoo

Isolat	Pewarnaan gram	Bentuk sel	Uji KOH
OBA1	Ungu (+)	<i>bacil</i>	-
OBA8	Ungu (+)	<i>bacil, rounded end</i>	-
OBA14	Ungu (+)	<i>bacil</i>	-
OCA7	Ungu (+)	<i>bacil</i>	-
ODA1	Ungu (+)	<i>bacil, rounded end</i>	-
OIA8	Ungu (+)	<i>bacil, rounded end</i>	-
OIA10	Ungu (+)	<i>coccus</i>	-

Keterangan: Uji KOH menunjukkan ada/tidaknya lendir. Adanya lendir ditandai dengan (+) yang berarti bakteri gram-negatif, sedangkan tidak adanya lendir ditandai (-) yang berarti bakteri gram-positif

Tabel 6. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom bakteri antagonis

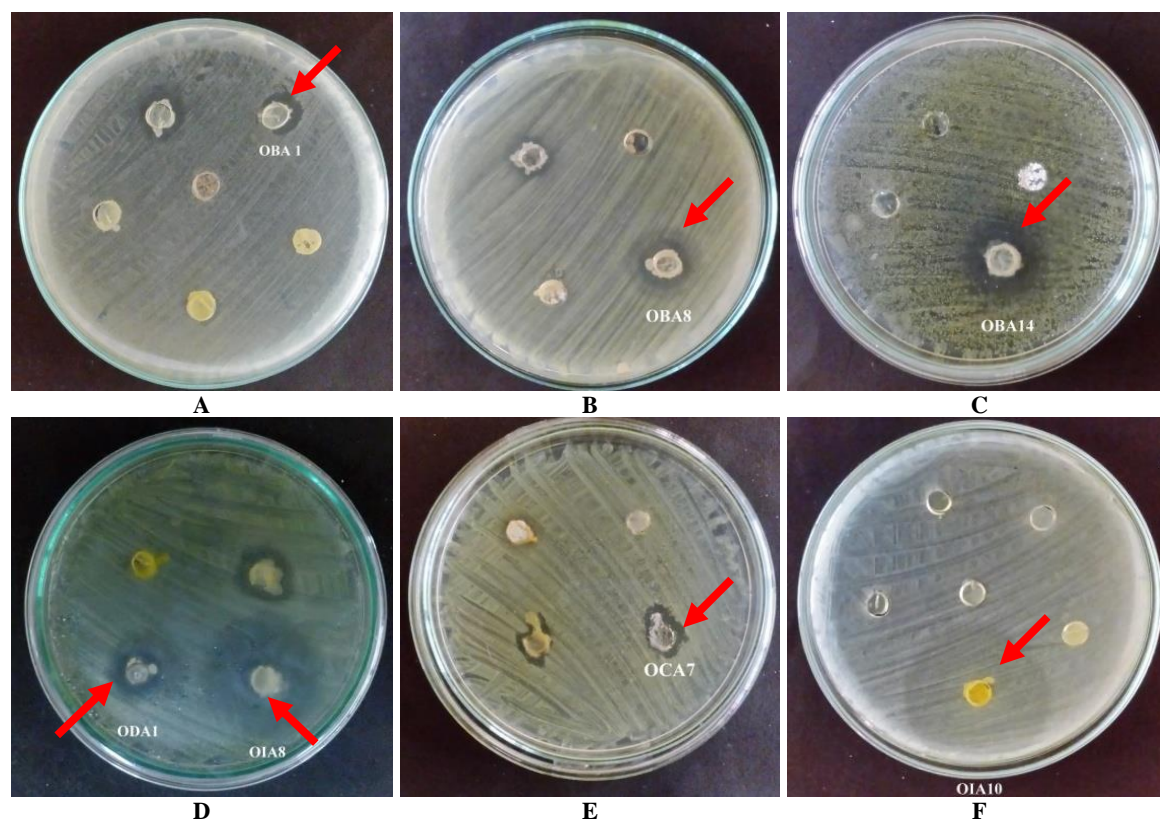
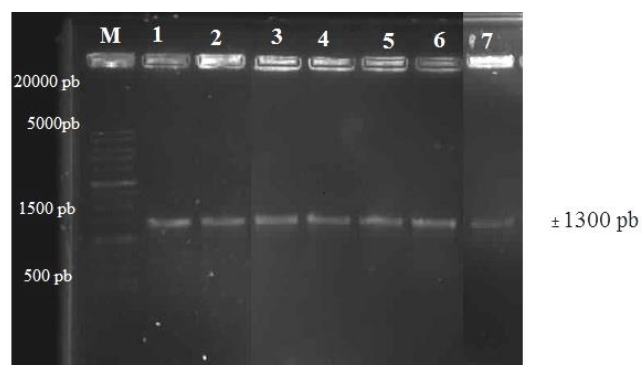
Kode isolat	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kemurnian (Rasio $A_{260}/280$)
OBA 1	31,9	1,94
OBA8	175,1	2,10
OBA14	154	2,13
OCA7	38,8	2,15
ODA1	202,3	2,17
OIA8	240	2,00
OIA10	306,8	2,00

Bakteri filosfer padi antagonis Xoo

Identifikasi morfologi dilakukan dengan mengamati morfologi sel, uji pewarnaan gram dan uji KOH 3%. Pengamatan sel menunjukkan sel berbentuk batang (*bacil*) kecuali isolat OIA10 berbentuk *coccus*. Berdasarkan pewarnaan gram, ketujuh isolat merupakan bakteri gram-positif, yakni berwarna ungu saat diamati. Bakteri gram-positif mempunyai lapisan peptidoglikan tebal sehingga lebih mudah menyerap kristal violet dan menahan warnanya dan tidak mudah terbilas etil-alkohol. Maka, bakteri gram-positif akan nampak berwarna ungu saat diamati. Jenis gram bakteri dijustifikasi dengan pengujian KOH 3% yang membenarkan bahwa semua bakteri merupakan gram-positif. Semua isolat tidak menghasilkan lendir saat pengujian KOH. Karakter morfologi sel bakteri filosfer disajikan pada Tabel 5.

Tabel 7. Kemiripan sekuen gen penyandi 16S rRNA bakteri antagonis dengan database pada *Gen Bank* di situs NCBI

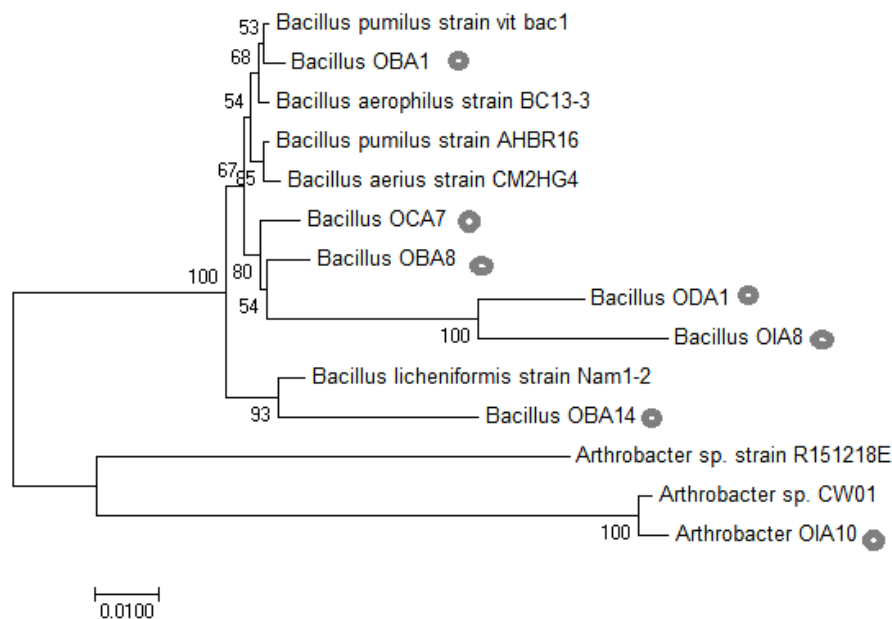
Isolat	Description	Max. score	Total score	Query cover	E. value	Identy	Accession
<i>Bacillus</i> OBA1	<i>Bacillus aerophilus</i> strain BC133 16S rRNA gene	2093	2093	98%	0.0	99%	KJ616371.1
<i>Bacillus</i> OBA8	<i>Bacillus pumilus</i> strain vit bac1 16S rRNA gene	1930	1930	97%	0.0	97%	KC845305.1
<i>Bacillus</i> OBA14	<i>Bacillus licheniformis</i> strain Nam12 16S rRNA gene	1690	1690	83%	0.0	97%	KP216563.1
<i>Bacillus</i> OCA7	<i>Bacillus pumilus</i> strain AHBR16 16S rRNA gene	1908	1908	94%	0.0	97%	KF241529.1
<i>Bacillus</i> ODA1	<i>Bacillus aerius</i> strain CM2HG4 16S rRNA gene	1615	1615	85%	0.0	95%	KU664828.1
<i>Bacillus</i> OIA8	<i>Bacillus aerophilus</i> strain BC133 16S rRNA gene	1502	1502	78%	0.0	96%	KJ616371.1
<i>Arthro-bacter</i> OIA10	<i>Arthrobacter</i> sp. CW01 16S rRNA gene	2049	2049	98%	0.0	98%	JX434848.1

**Gambar 1.** Aktivitas antagonis bakteri filofser padi terhadap *Xoo* ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekeliling *plug*. Keterangan: Zona bening yang dibentuk oleh isolat. A. OBA1 (ditunjukkan tanda panah merah), B. OBA8, C. OBA14, D. ODA1 (kiri) dan OIA8 (kanan), E. OCA7, 6= OIA10**Gambar 2.** Elektroforegram amplikon gen penyandi 16S rRNA dari ketujuh isolat bakteri antagonis. Keterangan: M=Marker, 1= OBA1, 2= OBA8, 3=OCA7, 4=ODA1, 5=OIA8, 6= OBA14, 7=OIA10

Kemurnian DNA genom dari bakteri filofser antagonis *Xoo* diketahui pada rasio absorbansi $A_{260/280}$. Kemurnian dan konsentrasi DNA genom Bakteri filofser antagonis disajikan dalam Tabel 6. Elektroforegram hasil elektroforesis menggunakan gel agarose 1% disajikan pada Gambar 2.

Elektroforegram di atas menunjukkan bahwa amplikon gen penyandi 16S rRNA dari bakteri filofser teramplifikasi dengan baik. Dari elektroforegram tersebut dapat diketahui amplikon mempunyai panjang sekitar ± 1300 pasang basa, dapat diamati dari letak *band* DNA dengan *band* marker yang digunakan.

Kemiripan sekuen gen penyandi 16S rRNA bakteri antagonis dengan data *GenBank* dapat dilihat pada Tabel 7.



Gambar 3. Pohon filogeni isolat bakteri filofser dengan beberapa bakteri lain berdasarkan sekuen gen penyandi 16S rRNA. Keterangan: Isolat bakteri filofser ditandai dengan lingkaran hitam. Isolat bakteri filofser terbagi menjadi dua grup, yakni *Bacillus* dan *Arthrobacter*. Isolat yang berada pada grup *Bacillus* yaitu *Bacillus* OBA1, *Bacillus* OBA8, *Bacillus* OBA14, *Bacillus* OCA7, *Bacillus* ODA1, dan *Bacillus* OIA8. Isolat dalam grup *Arthrobacter* yaitu *Arthrobacter* OIA10

Hubungan kekerabatan berdasarkan gen penyandi 16S rRNA

Hubungan kekerabatan bakteri filofser antagonis Xoo dengan beberapa spesies bakteri terdekat berdasarkan gen penyandi 16S rRNA hasil Blastn dapat diketahui dari pohon filogeni/ dendogram pada Gambar 3.

Pembahasan

Menurut data LPHPT Karesidenan Surakarta pada April 2015, terdapat 56 hektar persawahan di Kabupaten Klaten dan 226 hektar di Kota Surakarta yang termasuk dalam area waspada HDB, serta Kabupaten Sragen menjadi wilayah yang potensial terjadi HDB.

Infeksi penyakit merupakan salah satu faktor penentu produksi padi (Rezitis et al. 2015). Penyakit yang menyerang padi dapat disebabkan oleh invasi bakteri, seperti *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Li et al. 2015). Serangan Xoo dapat mengurangi berat panen hingga 50% pada kondisi tertentu (Wahyudi et al. 2011; Zamzami et al. 2014; Li et al. 2015).

Gejala penyakit HDB dapat diamati sejak tanaman berumur 1-4 minggu setelah tanam. Apabila gejala muncul saat tanaman padi masih muda, penyakit ini disebut kresak, sedangkan jika gejala muncul setelah tanaman dewasa, disebut hawar daun. Gejala daun padi yang terjangkit HDB yaitu munculnya garis kuning memanjang di tepi daun dan dapat menyebar ke seluruh helaian daun. Warna daun berubah cokelat dan diikuti kematian jaringan (Wahyudi et al. 2011). Pada gejala awal, kumpulan bakteri (ooze) dapat terbentuk dan teramati di tepian daun di pagi hari (OEPP/EPPO 2007).

Xoo menghasilkan polisakarida ekstraseluler (*extracellular polysaccharide*/EPS), menghasilkan enzim

protease, xilanase, esterase dan mempunyai flagelin serta TAL efektor tipe III. Polisakarida ekstraseluler (EPS) merupakan pentasakarida berulang dengan rantai utama berupa selulosa dan rantai samping berupa trisakarida. EPS disekresi dari xanthomonad, berperan dalam pembentukan biofilm, pertahanan dari kekeringan, serta sebagai faktor virulensi bersama efektor tipe III (Li et al. 2015). Sebagai faktor virulensi, EPS berperan dalam pembentukan *xanthan gum* atau pigmen xanthomonadin. Pigmen ini terlihat seperti lendir kuning di tepi daun saat pagi hari (Niño-Liu et al. 2006), berfungsi menularkan penyakit dengan perantara air hujan, atau gesekan antara daun yang terinfeksi dengan daun sehat (Sudir et al. 2012).

Interaksi bakteri dengan daun umumnya terjadi pada kutikula (Lindow dan Brandl 2003). Xoo menginfeksi jaringan tanaman melalui perlukaan, hidatoda atau pori-pori daun Yu et al. 2011; Li et al. 2015). Multiplikasi terjadi di epitem dan menyebar sistemik melalui xilem, dapat masuk ke dalam endosperm biji dan dapat bertahan lama di dalamnya, menyebabkan *seedborne disease* (Sudir et al. 2012). Mekanisme penyebaran penyakit dapat melalui gesekan, perantara air hujan atau irigasi (Zamzami et al. 2014).

Perbedaan anatomi daun, seperti panjang rambut daun, densitas stomata, temperatur daun serta laju transpirasi yang terjadi mempengaruhi jenis mikroorganisme filofser baik epifit maupun endofit (Sasaki et al. 2013). Filofser mempunyai struktur aerial kaya udara sehingga menyediakan air dan nutrisi bagi mikroorganisme (Lindow dan Brandl 2003).

Pada ekosistem mantap, organisme patogen dengan organisme antagonisnya berada pada kondisi seimbang

sehingga organisme patogen tidak menyebabkan kerusakan/penyakit parah pada tanaman. Interaksi organisme patogen dengan organisme antagonis terjadi secara alamiah dan dinamis. Kondisi ini juga berlaku pada interaksi antarmikroorganisme pada filofiler. Maka apabila senyawa kimia hadir dalam interaksi mikroorganisme di filofiler, keseimbangan interaksi antarmikroorganisme dapat terganggu (Fukuoka 2012). Dengan pemikian tersebut, maka penyakit yang berasal dari interaksi mikroorganisme akan dapat ditanggulangi dengan mikroorganisme lainnya yang bersifat antagonis. Pengendalian penyakit secara alamiah ini menjadi dasar dalam pengembangan biocontrol.

Biokontrol merupakan penggunaan organisme hidup, proses biologis atau produk dari proses biologis untuk mengurangi/menekan kelimpahan organisme penyebab penyakit dan menghindari kontak organisme patogen dengan organisme berguna, sehingga dapat mengurangi dampak kerusakan yang ditimbulkan dari organisme patogen (Eilenberg 2007). Mikroorganisme telah diteliti dan dikembangkan sebagai agen biokontrol (Jung et al. 2013). Beberapa mikroba untuk agen biokontrol antara lain *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma* dan beberapa Aktinobakteria (Diallo et al. 2011; Nimaichand et al. 2015).

Identifikasi bakteri kandidat agen biokontrol dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni dan sel bakteri, uji aktivitas biokimia, dan analisis sekuen gen penyandi 16S rRNA. Pengamatan mikroskopis digunakan untuk identifikasi awal. Untuk identifikasi genus/spesies dan kedudukannya dalam taksonomi dilakukan dengan teknik analisis sekuen gen penyandi 16S ribosomal RNA (Muladno 2010).

Pada bakteri, gen penyandi 16S rRNA mempunyai daerah yang konservatif sehingga dapat menunjukkan kekerabatan antarspesies (Patantis dan Fawzya 2009). Dari percobaan Marchesi et al. (1998), pasangan primer 63f-1387r terbukti lebih berhasil dan konsisten untuk mengamplifikasi gen penyandi 16S rRNA dari berbagai jenis bakteri. Pasangan primer 63f-1387r akan menghasilkan 1300 amplikon (Hoa et al. 2014). Fragmen ini merupakan kompleks yang bersifat umum pada domain bakteri yang bisa digunakan untuk analisis kemiripan berdasarkan susunan basa nukleotida bakteri (Klindworth et al. 2013).

Penjajaran basa nukleotida dari ketujuh isolate bakteri filofiler antagonis Xoo menunjukkan bahwa isolate memiliki kemiripan dengan *Bacillus* dan *Arthrobacter* dengan rentang kemiripan 95-99%. Isolat OBA1 memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus aerophilus* strain BC133. Menurut Bosshard et al. (2003), dengan kemiripan 99%, maka isolate OBA1 merupakan satu spesies dengan *Bacillus aerophilus* strain BC133. Isolat OBA8, OBA14, OCA7, ODA1 dan OIA8, dengan kemiripan 95-97%, maka termasuk satu genus *Bacillus*. Kemiripan paling rendah adalah isolate ODA1, yakni 95% dengan *Bacillus aerius* strain CM2HG4. Isolat OIA10 dengan kemiripan 98% berada satu genus dengan *Arthrobacter*.

Dari Pohon filogeni, diketahui bahwa isolate bakteri filofiler terbagi menjadi dua grup, yakni genus *Bacillus*

dan *Arthrobacter*. Isolat *Bacillus* OBA1, OBA8, OBA14, OCA7, ODA1, dan OIA8 memiliki hubungan kekerabatan dengan beberapa *Bacillus* dalam database *GenBank*, yakni *B. licheniformis* strain Nam-12, *B. aerius* strain CM2HG4, *B. pumilus* strain AHBR16 dan strain vit bac-1, *B. aerophilus* strain BC13-3. Isolat bakteri *Arthrobacter* OIA10 memiliki kekerabatan dengan *Arthrobacter* sp. CW01 dan *Arthrobacter* sp. strain R151218E.

Untuk penelitian lebih lanjut, diperlukan ekstraksi senyawa dari bakteri filofiler kandidat agen biokontrol untuk mengetahui senyawa aktif yang dapat mengendalikan Xoo. Lebih jauh lagi, diperlukan pengujian *inplanta* untuk mengetahui interaksi antarmikroorganisme atau senyawanya pada lingkungan yang dikondisikan. Pengujian tersebut berguna sebelum bakteri filofiler antagonis Xoo dapat dinyatakan sebagai agen biocontrol yang dapat digunakan secara luas untuk membantu pengendalian penyakit pada tanaman pangan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta; Laboratorium Pengamatan Hama dan Penyakit Tanaman (LPHPT) wilayah Surakarta.

DAFTAR PUSTAKA

- Bosshard P, Abels S, Zbiden R, Bottger E, Altwegg M. 2003. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory: an 18-month evaluation. *J Clin Microbiol* 41: 4134-4140.
- Diallo S, Crepin A, Barbey C, Orange N, Burini JF. 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 75 (3): 351-364.
- Eilenberg J. 2007. Concept and vision of biocontrol. In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds.). *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer, Netherlands.
- Fukuoka M. 2012. *Revolusi Sebatang Jerami*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Hernández AF, Parrón T, Tsatsakisd AM, Requenab M, Alarcón R, López-Guarmidoa O. 2012. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology* 307: 136-145.
- Hoa P, Hop D, Quang N, Ton P, Ha T, Hung N. 2014. Biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial blight disease by *Streptomyces toxytricini* VN08-A-12, isolates from soil and leaf-litter samples in Vietnam. *Biocontrol Sci* 19: 103-111.
- Jung B, Park SS, Lee YW, Lee J. 2013. Biological efficacy of *Streptomyces* sp. strain BN1 against the cereal head blight pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Pathol J* 29 (1): 52-58.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41 (1): e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.
- Laboratorium Pengamatan Hama dan Penyakit Tanaman. 2015. *Data Luas Serangan OPT Padi Wilayah Surakarta*. LPHPT, Sukoharjo.
- Li H, Yu C, Chen H, Tia, F, He C. 2015. PXO_00987, a putative acetyltransferase, is required for flagellin glycosylation, and regulates flagellar motility, exopolysaccharide production, and biofilm formation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Microbial Pathogenesis* 85: 50-57.
- Lindow SE, Brandl MT. 2003. Minireview: Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environl Microbiol* 69 (4): 1875-1883.

- Ma R, Shen J, Wu J, Tang Z, Shen Q, Zhao F. 2014. Impact of agronomic practices on arsenic accumulation and speciation in rice grain. *Environ Pollut* 194: 217-223.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64 (2):795-799.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. IPB Press, Bogor.
- Mustikarini F, Retnaningsih SM. 2014. Kepuasan dan loyalitas petani terhadap pestisida. *Jur Ilm Kel & Kons* 7 (2): 93-102.
- Nanjwade BK, Chandrashekhara, Shamarez AM, Goudanavar PS, Manvi FV. 2010. Isolation and morphological characterization of antibiotic producing Actinomycetes. *Trop J Pharm Res* 9: 231-236.
- Nimaichand S, Devi AM, Tamreihao K. 2015. Actinobacterial diversity in limestone deposit sites in hujung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. *Front Microbiol* 6: 413. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00413
- Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanovic AJ. 2006. Pathogen profile: *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol* 7: 303-324.
- Patantis G, Fawzya Y. 2009. Teknik identifikasi mikroorganisme secara molekuler. *Squalen Bull Mar Fish Postharvest Biotechnol* 4 (2): 10.15578/squalen.v4i2.146.
- Rezitis AN, Ntinou GA, Pachis DN. 2015. Investigating the international prices of wheat and rice. *Agric Food Econ* 3: 16. DOI: 10.1186/s40100-015-0035-4
- Sasaki K, Ikeda S, Ohkubo T, Kisara C, Sato T, Minamisawa K. 2013. Short communication: Effects of plant genotype and nitrogen level on bacterial communities in rice shoots and roots. *Microbes Environ* 28: 391-395.
- Sudir B, Nuryanto, Kadir TS. 2012. Epidemiologi, patotipe, dan strategi pengendalian penyakit. *Iptek Tanaman Pangan* 7 (2): 79-87.
- Talaro KP. 2008. *Foundation in Microbiology: Basic Principle*. 6th ed. McGraw-Hill, New York.
- Wahyudi AT, Meliah S, Nawangsih AA. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: Isolasi, karakterisasi dan telaah mutagenesis dengan transposon. *Makara Seri Sains* 15 (1): 89-96.
- Wang S, Sun Z, Wang H, Liu L, Lu F, Yang J. 2015. Rice OsFLS2-mediated perception of bacterial. *Mol Plant* 8: 1024-1037.
- Yu Y, Streubel J, Balergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R. 2011. Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new tal effector that induces the rice Nodulin-3 Os11N3 gene. *Mol Plant-Microbe Interact* 24 (9): 1102-1113.
- Zamzami A, Ilyas S, Machmud M. 2014. Perlakuan agens hayati untuk mengendalikan hawar daun bakteri dan meningkatkan produksi benih padi sehat. *J Agron Indonesia* 42(1): 1-8.