

## KOMUNIKASI SINGKAT

### Isolasi dan Penapisan *in Vitro* Aktinomiset untuk Mengendalikan *Xanthomonas*

#### Actinomycetes Isolation and In Vitro Screening for *Xanthomonas* Biocontrol

Yuvika, Aswardi Nasution, Abdul Gafur\*  
AAA Fiber R&D, Riau 28300

#### ABSTRAK

Penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas* sp. sering ditemui pada bibit tanaman *Acacia crassiparva* dengan gejala yang diawali oleh bintik-bintik kecil pada daun yang dapat berkembang menjadi hawar daun jika faktor lingkungan kondusif bagi perkembangan penyakit. Aktinomiset merupakan mikroorganisme yang menghasilkan senyawa aktif alami berupa enzim dan antibiotik sehingga aktinomiset layak untuk dipertimbangkan sebagai kandidat agens pengendali penyakit tanaman yang disebabkan oleh bakteri. Pada penelitian ini efektivitas aktinomiset yang diisolasi dari sejumlah lokasi yang berbeda terhadap *Xanthomonas* diuji secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini mendapatkan isolat aktinomiset yang efektif terhadap *Xanthomonas* untuk mengurangi dampak patogen tersebut terhadap kualitas bibit *A. crassiparva*. Seluruh koleksi aktinomiset diisolasi dari tanah melalui serangkaian prosedur isolasi pengayaan. Aktivitas antibiotik koleksi diuji melalui penapisan antimikrob menggunakan *paper disc* pada cawan Petri uji. Sebanyak 75 isolat aktinomiset telah berhasil dikumpulkan dan kemudian diuji. Sebanyak 5 isolat menunjukkan aktivitas antimikrob yang baik dan karena itu merupakan kandidat agens pengendali hayati *Xanthomonas* yang potensial.

Kata kunci: *Acacia crassiparva*, agens hayati, antibiotik, hawar daun

#### ABSTRACT

Nursery disease frequently found on *Acacia crassiparva* seedlings is bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas* sp. Disease symptom starts as a small fleck on the leaf which may then develop to leaf strike or leaf blight if the environmental factors are conducive to disease development. Actinomycetes are soil microorganisms that produce biologically active substances such as enzymes and antibiotics. These compounds could inhibit growth of other microorganisms, particularly bacteria. Thus, Actinomycetes are considered as potential candidates of biocontrol agents for plant pathogens. In the current study Actinomycetes isolated from a wide range of localities were screened for their efficacy against *Xanthomonas* sp. *in vitro*. The objective of this study was to obtain Actinomycete isolates effective against *Xanthomonas*, to mitigate impact of the pathogen on quality of *A. crassiparva* seedlings. All Actinomycete collections were isolated from soil by a chain of enrichment isolation procedures. The antibiotic activities were investigated through antimicrobial screening tests using paper discs on assay plates. Of the 75 Actinomycete isolates originally collected and screened, 5 isolates showed good antimicrobial activities against *Xanthomonas* and are therefore considered as potential biocontrol agent candidates.

Key words: *Acacia crassiparva*, antibiotic, biocontrol agent, leaf blight

\*Alamat penulis korespondensi: RGE Technology Center, Pangkalan Kerinci, Riau 28300  
Tel: 0761-95550 ext. 3125, Faks: 0761-95306, Surel: [abdul\\_gafur@aprilasia.com](mailto:abdul_gafur@aprilasia.com); [gafur@uwalumni.com](mailto:gafur@uwalumni.com)

*Xanthomonas* merupakan bakteri Gram negatif yang dapat menyebabkan penyakit hawar daun pada beberapa tanaman, salah satunya bibit tanaman *Acacia crassicarpa*. Bagian tanaman yang terinfeksi *Xanthomonas*, khususnya daun, perlahan-lahan akan mengalami kematian jaringan di sekitar titik serangan untuk menghindari penyebaran serangan tersebut ke jaringan lainnya. Hal tersebut termanifestasi pada gejala bercak-bercak kecil dan perubahan warna pada daun. Bila kondisi lingkungan kondusif bagi penyakit, bercak akan berkembang menjadi hawar.

Penanganan untuk mengurangi risiko penyakit hawar daun pada bibit *A. crassicarpa* telah dilakukan dengan banyak cara (Tjahjono *et al.* 2010), namun pengendalian penyakit menggunakan bahan kimiawi cepat atau lambat dapat menimbulkan masalah ketahanan terhadap patogen dan mengganggu keseimbangan alam. Peningkatan kepedulian terhadap sumber daya alam mengarah pada pemanfaatan agens pengendali hayati. Penggunaan agens pengendali hayati memberi dampak secara perlahan, namun dapat bertahan cukup lama, relatif hemat, dan tidak membahayakan lingkungan (Bafti *et al.* 2005).

Aktinomiset merupakan mikroorganisme yang telah dikenal dapat dimanfaatkan sebagai agens pengendali hayati dan juga mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme penyebab penyakit pada tanaman (Baniasadi *et al.* 2009). Kemampuan tersebut didukung oleh karakter alami aktinomiset yang dapat menghasilkan berbagai jenis senyawa metabolit sekunder dan senyawa aktif alami yang bernilai jual tinggi seperti enzim dan antibiotik. Sebagian besar aktinomiset hidup sebagai saprob di dalam tanah, sebagian lagi menempati ekosistem darat lainnya dan perairan.

Dalam penelitian yang telah dilakukan sebelumnya terhadap aktinomiset yang didapat dari beberapa daerah pantai, isolat tersebut mampu menghambat biakan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Stenotrophomonas maltophilia* (Ceylan *et al.* 2008). Selain itu, dalam penelitian

lain aktivitas antimikrob aktinomiset tanah diteliti terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Ambarwati dan Gama 2009), *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei* (Singh *et al.* 2006), *Sclerotium rolfsii* (Widyanti dan Giyanto 2013). Oleh karena itu, penggunaan aktinomiset layak dipertimbangkan sebagai kandidat untuk menangani penyakit tanaman, khususnya yang disebabkan oleh bakteri. Tujuan penelitian ialah mengisolasi aktinomiset dari sampel tanah dan melakukan penapisan *in vitro* isolat yang efektif terhadap bakteri *Xanthomonas* untuk mengurangi penyakit pada bibit *A. crassicarpa*.

Pengambilan sampel tanah dilakukan di beberapa area hutan tanaman industri di wilayah Riau sebanyak 100 g. Sampel tanah yang diperoleh dikeringanginkan selama kurang lebih 7 hari kemudian dihaluskan. Sebanyak 1 g sampel tanah kering yang sudah halus dimasukkan ke dalam 100 mL larutan NaCl 0.8%. Campuran kemudian dipanaskan dalam pemanas air pada suhu 55 °C selama 30 menit, kemudian diinkubasi di atas pengocok pada kecepatan 180 rpm suhu 28 °C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai dilakukan pengenceran sampai  $10^{-4}$  dan diambil sebanyak 1 mL untuk diinokulasi pada medium *casein glycerol agar* (CGA) dengan metode cawan tuang. Biakan aktinomiset yang tampak dari hasil isolasi tersebut sampai 2 minggu inkubasi dimurnikan pada medium CGA baru.

Biakan *Xanthomonas* uji diperoleh dari daun bibit tanaman *A. crassicarpa* yang terserang penyakit bercak daun. Daun diambil dan dibersihkan kemudian dicacah dan dimasukkan ke dalam air steril kemudian diaduk dengan vorteks selama beberapa menit pada kecepatan 1500 rpm. Inokulan diambil menggunakan jarum ose untuk diinokulasi dengan cara digores pada medium *nutrient agar* (NA). Setelah inkubasi 4–5 hari koloni *Xanthomonas* akan tampak berwarna kuning.

Setiap isolat aktinomiset diuji terhadap biakan *Xanthomonas*. Isolat aktinomiset murni dibiakkan pada medium *casein glycerol* cair dan diinkubasi pada pengocok selama 7 hari dengan kecepatan 180 rpm dan suhu 28 °C.

Selanjutnya, 10 mL biakan aktinomiset disentrifugasi dengan kecepatan 400 rpm selama 5 menit pada suhu ruang untuk mendapatkan supernatan yang mengandung senyawa aktif. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan untuk merendam cakram kertas steril dengan diameter 6 mm selama beberapa saat. Cakram kertas diletakkan di empat titik pada permukaan biakan baru bakteri *Xanthomonas* yang disebar merata pada medium NA. Inkubasi dilakukan selama 14 hari pada suhu ruang. Pengamatan aktivitas antibiotik dilakukan pada hari ke-3, 8, dan 14 inkubasi dan hasil pengukuran zona hambat dicatat.

Isolat aktinomiset murni diperoleh dengan memisahkan koloni melalui pengamatan secara visual terhadap hasil pencawan yang telah diinkubasi. Aktinomiset termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram positif yang memiliki filamen, dapat membentuk miselium, dan sebagian besar memiliki spora. Pada penelitian ini diperoleh 75 isolat aktinomiset murni. Isolat tersebut tampak melekat kuat mencengkeram medium agar-agar, membentuk miselium dalam pertumbuhannya dan sebagian membentuk spora.

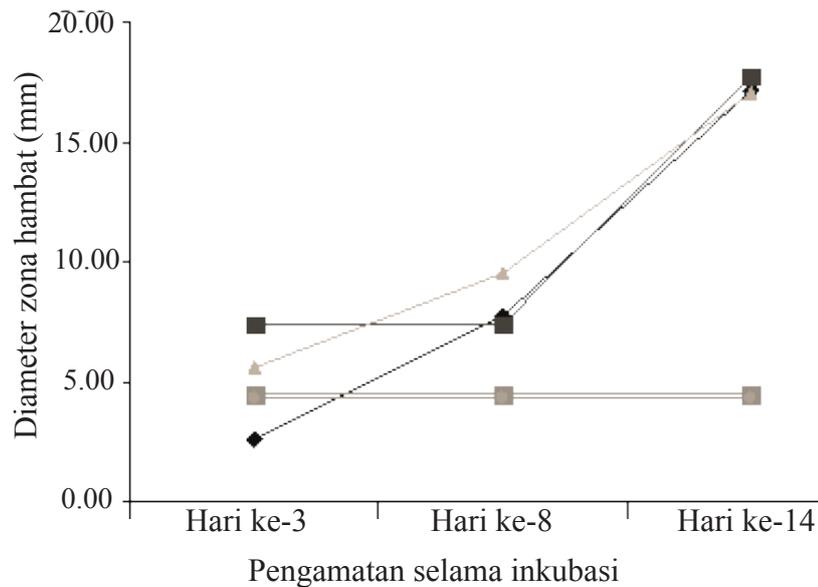
Sebanyak 75 isolat aktinomiset telah diisolasi dari berbagai sampel tanah basah dari lokasi dan dengan karakter yang berbeda. Pengujian aktivitas antimikrob terhadap *Xanthomonas* dilakukan pada seluruh isolat aktinomiset yang berhasil diisolasi. Peubah digunakan untuk menentukan aktivitas antimikrob ialah terbentuknya zona hambat. Lima isolat aktinomiset menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk dengan tahapan berbeda.

Menurut Watve *et al.* (2001), sebagian besar jenis antibiotik yang telah ditemukan didapat dari genus *Streptomyces*. *Streptomyces* termasuk dalam kelompok bakteri berfilamen aktinomiset, banyak ditemukan di tanah dan memiliki karakter aroma tanah. Isolat aktinomiset yang didapat pada umumnya diperoleh dari lapisan atas tanah yang biasanya mengandung banyak humus. Errakhi *et al.* (2009) mengisolasi aktinomiset dari tanah yang diambil sampai kedalaman

10 cm setelah menghilangkan sekitar 3 cm bagian permukaan tanah. Pengambilan sampel tanah dengan mengikuti metode ini diasumsikan mendapatkan tanah yang menjadi tempat hidup genus *Streptomyces* yang diketahui memiliki aktivitas antibiotik.

Senyawa aktif yang dihasilkan oleh aktinomiset dapat memiliki mekanisme yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan isolat *Xanthomonas*. Lima aktinomiset yang diperoleh menunjukkan aktivitas antimikrob yang paling baik. Hal ini menunjukkan bahwa kelima isolat aktinomiset tersebut mampu menghasilkan senyawa antimikrob yang menghambat pertumbuhan bakteri *Xanthomonas*. Mekanisme aksi senyawa antibiotik terhadap target telah diketahui dan dapat dikelompokkan bergantung pada interaksi senyawa antibiotik dengan target yang berupa fungsi-fungsi yang penting pada sel. Interaksi inilah yang menjadi kunci penghambatan pertumbuhan bakteri. Di dalam sel, proses ini dimulai dengan interaksi antara molekul antibiotik dan target spesifik yang akan mengakibatkan perubahan molekuler, biokimia, dan struktural. Proses yang menjadi target dalam mekanisme aksi senyawa antibiotik ialah replikasi DNA, sintesis RNA, sintesis dinding sel, dan sintesis protein (Lima-Procopio 2012). Aktivitas antimikrob dari hasil uji kelima isolat dalam penelitian ini diasumsikan dapat dijelaskan karena mekanisme aksi senyawa antibiotik yang dihasilkan.

Zona hambat dari kelima isolat yang diuji pada penelitian ini ternyata menunjukkan tahapan proses pembentukan yang berbeda. Isolat STA 028, STA 046, dan STA 087 memiliki pola pembentukan zona hambat yang cenderung meningkat pada setiap pengamatan, sedangkan isolat STA 077 dan STA 080 memiliki pola pembentukan zona hambat yang cenderung konstan sejak pengukuran pertama (3 hari) hingga terakhir (14 hari) (Gambar 1). Hal ini kemungkinan terjadi karena perbedaan mekanisme penghambatan dari senyawa aktif yang juga berbeda yang dihasilkan oleh masing-masing isolat aktinomiset tersebut seperti dijelaskan oleh Lima-Procopio (2012).



Gambar 1 Tahapan proses pembentukan zona hambat lima isolat aktinomiset selama 14 hari inkubasi. —◆—, STA 028; —■—, STA 046; —■—, STA 077; —■—, STA 080; —▲—, STA 087.

Pengelompokan aktivitas penghambatan isolat aktinomiset pada pertumbuhan bakteri uji dengan diameter 5–9 mm termasuk katagori lemah, 10–19 mm termasuk katagori sedang, dan  $\geq 20$  mm termasuk katagori kuat (Lee dan Hwang 2002). Diameter zona hambat yang diukur tidak termasuk diameter cakram kertas yang digunakan dalam percobaan. Hasil uji aktivitas antimikrob yang dilakukan pada percobaan ini menunjukkan bahwa isolat STA 028, STA 046, dan STA 087 memiliki daya hambat dalam kategori sedang; sedangkan aktivitas isolat lainnya belum dapat dikategorikan sesuai pengelompokan Lee dan Hwang (2002) karena ukuran diameter zona hambat yang dibentuk di bawah ambang batas kategori lemah.

Dalam Jiang dan Xu (1990) ditulis bahwa kelompok genus *Streptomyces* banyak ditemukan di tanah yang lebih kering dan tandus. Oleh karena itu, pengambilan sampel tanah selain memperhatikan lapisan atas (top soil) juga mengutamakan tanah yang kering karena banyak menyimpan spora aktinomiset. Sampel tanah yang sesuai dengan karakter tempat hidup aktinomiset diasumsikan memiliki lebih banyak spora aktinomiset yang dapat terisolasi. Semakin banyak isolat aktinomiset yang berhasil diisolasi, semakin

besar peluang mendapatkan isolat yang memiliki aktivitas antimikrob yang baik, khususnya terhadap *Xanthomonas*.

Pada beberapa penelitian, isolat potensial aktinomiset yang diseleksi dari hasil uji *in vitro* telah diuji secara *in vivo* terhadap *Sclerotium rolfsii* pada bibit tanaman gula bit (Errakhi *et al.* 2009), dan tanaman cabai (Pattanapitpaisal dan Kamlandharn 2012). Selain itu, isolat aktinomiset juga diuji *in vivo* terhadap *Sclerotinia sclerotiorum* pada bibit tanaman bunga matahari (Baniasadi *et al.* 2009), dan *Magnaporthe oryzae* pada bibit tanaman padi (Zarandi *et al.* 2009). Efektivitas *in vivo* isolat aktinomiset tersebut berbeda-beda bergantung pada jenis isolat yang digunakan, mikroorganisme patogen yang dikendalikan, tanaman inang yang diserang, dan tidak terkecuali faktor eksternal lain yang mempengaruhi secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, isolat aktinomiset yang telah diketahui memiliki aktivitas antimikrob yang baik dari uji *in vitro* layak untuk diuji secara *in vivo*. Penapisan *in vitro* penggunaan aktinomiset sebagai agens pengendali hayati yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan adanya isolat yang potensial dalam mengendalikan bakteri *Xanthomonas*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, Gama TA. 2009. Isolasi aktinomycetes dari tanah sawah sebagai penghasil antibiotik. *J Penel Sains Teknol.* 10(2):101–111.
- Bafti SS, Bonjar GHS, Aghighi S, Biglari S, Farrokhi PR, Aghelizadeh A. 2005. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, the causal agent of root rot disease of greenhouse cucurbits in Kerman Province of Iran. *Am J Biochem Biotechnol.* 1(1):22–26. DOI: <http://dx.doi.org/10.3844/ajbbsp.2005.22.26>.
- Baniasadi F, Bonjar GHS, Baghizadeh A, Nik AK, Jorjandi M, Aghighi S, Farokhi PR. 2009. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease by use of soil borne actinomycetes isolates. *Am J Agri Biol Sci.* 4(2):146–151. DOI: <http://dx.doi.org/10.3844/ajabssp.2009.146.151>.
- Ceylan O, Okmen G, Ugur A. 2008. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eur Asian J Biosci.* 2:73–82.
- Errakhi R, Lebrihi A, Barakate M. 2009. *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J Appl Microbiol* 107:672–681. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04232.x>.
- Jiang CL, Xu LH. 1990. Characteristics of the populations of soil actinomycetes in Yunnan. *Actinomycetes.* 1(3):67–74.
- Lee JY dan Hwang BK. 2002. Diversity of antifungal and actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol.* 48(5):407–417. DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/w02-025>.
- Lima-Procopio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araujo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 16(5):466–471. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>.
- Pattanapitpaisal P, Kamlandharn R. 2012. Screening of chitinolytic actinomycetes for biological control of *Sclerotium rolfsii* stem rot disease of chilli. *Songklanakarinn J Sci Technol* 34(4):387–393.
- Singh LS, Baruah I, Bora TC. 2006. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology.* 5(2):217–221. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2006.217.221>.
- Tjahjono B, Ernawati NML, Giyanto, Gafur A. 2010. Bacterial leaf blight on *Acacia crassicarpa* caused by *Xanthomonas campestris* in Indonesia. Di dalam: *Prosiding ISSAAS International Congress*; 2010 Nov 14–18; Bali (ID): ISSAAS.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Arch Microbiol.* 176(5):386–390. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002030100345>.
- Widyanti N, Giyanto. 2013. Kemampuan aktinomiset menghambat pertumbuhan *Sclerotium rolfsii* dan pembiakannya pada medium serbuk gergaji. *J Fitopatol Indones.* 9(1):7–14. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.9.1.7>.
- Zarandi ME, Bonjar GHS, Dehkaei FP, Moosavi SAA, Farokhi PR, dan Aghighi S. 2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *Amer J Appl Sci* 6(1):194–199. DOI: <http://dx.doi.org/10.3844/ajabssp.2009.194.199>.