

Eksplorasi dan Karakterisasi Khamir dan Bakteri sebagai Agens Antagonis terhadap Penyebab Penyakit Blas pada Padi

Exploration of Yeasts and Bacteria as Antagonist Agent of Rice Blast Pathogen

Jauharoh Maknunah, Meity Suradji Sinaga*
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Penyakit blas (*Pyricularia oryzae*) merupakan salah satu penyakit utama pada padi yang dapat menyebabkan kerugian mencapai 61%. Salah satu cara pengendalian penyakit blas ialah memanfaatkan agens antagonis, baik khamir maupun bakteri. Penelitian ini bertujuan mendapatkan galur khamir dan bakteri yang berpotensi efektif untuk mengendalikan penyakit blas. Khamir dan bakteri diisolasi dari daun *Digitaria* sp., *Panicum* sp., dan *Pennisetum* sp.. Khamir dan bakteri tersebut diseleksi melalui uji hipersensitif pada daun tembakau, uji tanam langsung pada benih padi ‘Ciherang’, dan uji hemolisis pada medium agar-agar darah. Galur khamir dan bakteri nonpatogen diuji antagonismenya melalui uji kultur ganda, uji pembentukan senyawa volatil, uji hiperparasitisme, dan uji aktivitas kitinolitik. Tiga jenis khamir (*Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp., dan *Candida* sp.) dan dua jenis bakteri (*Bacillus* sp. dan isolat PPY) berpotensi sebagai agens antagonis *P. oryzae*.

Kata kunci: hiperparasitisme, kitinolitik, senyawa volatil, uji hemolisis, uji hipersensitif

ABSTRACT

Blast disease (*Pyricularia oryzae*) is a major disease of rice that causes 61% yield losses. An alternative way to control the disease is applying antagonistic agents, both yeasts and bacteria. This study was aimed to obtain yeast and bacterial isolates that can be used as antagonistic agents to effectively control blast disease. Yeasts and bacteria were isolated from the leaves of *Digitaria* sp., *Panicum* sp., and *Pennisetum* sp.. The isolates of yeasts and bacteria were screened following hypersensitive test on tobacco leaves, direct planting method test on ‘Ciherang’ rice seed, and hemolysis test on blood agar medium. The isolates were also further assayed for their antagonism through dual culture test, volatile compound test, hyperparasitism test, and chitinolytic activity test. Three isolates of yeast, i.e. *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp., and *Candida* sp., and two bacterial isolates, i.e. *Bacillus* sp. and isolate PPY were identified as potential antagonists of *P. oryzae*.

Key words: chitinolytic, hemolysis test, hyperparasitism, hypersensitive test, volatile compound

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.
Tel: 0251-7533525, Faks : 0251-8629364, Surel: mssinaga@yahoo.com.

PENDAHULUAN

Padi merupakan tanaman pangan terpenting di Indonesia. Produktivitas padi belum optimal disebabkan oleh cekaman abiotik maupun biotik. Salah satu faktor biotik ialah penyakit blas yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* yang dapat menyebabkan kehilangan hasil sampai 61% (Suganda *et al.* 2016).

Pengendalian penyakit blas yang umum dilakukan ialah penggunaan varietas tahan dan penggunaan fungisida. Penggunaan varietas tahan menjadi kurang efektif karena *P. oryzae* sangat cepat membentuk ras baru (Reflinur *et al.* 2005). Varietas padi IR64 yang awalnya tahan blas, kini dapat terserang oleh *P. oryzae* ras 041, 54 043, 051,061, 073, 141, 161, dan 173 (Yuliani dan Maryana 2014). Upaya lain untuk mengendalikan blas dilakukan menggunakan fungisida (Suganda *et al.* 2016), namun jika tidak tepat justru dapat memicu resistensi patogen. Fungisida blasticidin-S, IBP, dan carproamid sudah tidak efektif mengendalikan penyakit blas karena munculnya ras patogen yang lebih resisten (Takagi *et al.* 2004). Fungisida juga meninggalkan residu yang berbahaya bagi mikroorganisme dan organisme nontarget.

Dewasa ini, banyak upaya pengembangan pengendalian alternatif yang efektif dan lebih ramah lingkungan, misalnya dengan memanfaatkan agens antagonis, baik bakteri maupun khamir. Keberadaan mikroorganisme pada daun (filoplan) dapat berpengaruh positif terhadap tanaman, misalnya dengan mencegah kolonisasi patogen pada daun, memacu pertumbuhan tanaman, memiliki mekanisme antagonis, dan menginduksi ketahanan tanaman (Dees *et al.* 2015).

Bakteri endofit yang diisolasi dari akar padi gogo di Jawa dan Sumatera menunjukkan reaksi antibiosis terhadap *Rhizoctonia solani* dan *P. grisea* pada medium agar dekstrosa kentang (ADK) dan *tryptic soy agar* (TSA), serta dapat memacu pertumbuhan akar dan tajuk tanaman padi (Munif *et al.* 2012). Bakteri rizosfer *Bacillus cereus* 11UJ memiliki daya hambat yang kuat terhadap *P. oryzae* (Suryadi

et al. 2015). Selain bakteri, cendawan endofit yang diisolasi dari tanaman padi sawah juga mampu menekan perkembangan penyakit blas dengan tingkat penekanan mencapai 70% (Sucipto *et al.* 2015). Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat khamir dan bakteri yang berpotensi efektif dalam mengendalikan penyakit blas.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Identifikasi Khamir dan Bakteri

Khamir dan bakteri diisolasi dari daun *Digitaria* sp., *Panicum* sp., dan *Pennisetum* sp., metode isolasi merujuk pada Hartati *et al.* (2014). Khamir dan bakteri yang diperoleh disimpan pada medium ADK miring. Identifikasi khamir dan bakteri dilakukan berdasarkan morfologi koloni dan bentuk mikroskopis, karakteristik koloni yang tumbuh juga diamati.

Uji Patogenisitas

Uji patogenitas dilakukan untuk mengetahui potensi mikroorganisme uji sebagai patogen. Beberapa uji yang dilakukan ialah uji hiperparasitisme pada daun tembakau, uji tanam langsung (*direct planting method*-DPM) pada benih padi Ciherang, dan uji hemolisis pada medium agar-agar darah. Masing-masing uji dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Mikroorganisme uji dibiakkan pada medium larutan dekstrosa kentang (LDK) dan dikocok dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Suspensi mikroorganisme uji disuntikkan pada daun tembakau untuk menentukan hipersensitifnya. Pengamatan gejala nekrosis dilakukan setelah 24 dan 48 jam (Hartati *et al.* 2014).

Uji DPM dilakukan menggunakan 10 benih padi varietas Ciherang untuk setiap perlakuan. Mikroorganisme uji dibiakkan pada medium ADK 20%. Benih yang digunakan disterilkan menggunakan NaOCl 1% selama 1 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 2 kali. Benih ditanam pada biakan mikroorganisme uji yang berumur 24 jam. Sebagai perlakuan kontrol positif digunakan

benih padi yang ditanam pada biakan *P. oryzae* berumur 10 hari. Kontrol negatif menggunakan benih yang ditanam pada medium ADK 20% tanpa biakan *P. oryzae*. Pengamatan dilakukan selama 10 hari (Sucipto 2016).

Uji aktivitas hemolisis dilakukan berdasarkan metode Manns *et al.* (1994). Mikroorganisme uji diinokulasi pada medium agar-agar darah dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Zona bening atau hijau kecokelatan yang terbentuk di sekitar biakan isolat menandakan mikroorganisme uji yang diinokulasikan mampu menguraikan sel darah (hemolisis) yang terdapat pada medium, sehingga berpotensi sebagai patogen bagi mamalia.

Uji Keefektifan Mikroorganisme Uji terhadap *P. oryzae* secara *in Vitro*

Dalam penelitian ini dilakukan beberapa metode pengujian untuk mengetahui keefektifan mikroorganisme uji dalam menekan *P. oryzae*. Beberapa pengujian yang dilakukan, yaitu uji hiperparasitisme, uji kultur ganda, uji produksi senyawa volatil, dan uji aktivitas kitinolitik. Setiap pengujian dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Uji hiperparasitisme dilakukan pada medium ADK 20% yang dipotong berukuran 2 cm x 2 cm dan diletakkan di atas kaca objek. Potongan biakan *P. oryzae* diletakkan di atas blok ADK 20% sementara biakan mikroorganisme uji digores melingkari potongan *P. oryzae*, kemudian ditutup menggunakan kaca tutup dan diinkubasi selama 7 hari. Pengamatan terjadinya interaksi hiperparasitisme dilakukan menggunakan mikroskop (Hartati *et al.* 2014).

Uji kultur ganda dilakukan dengan menggoreskan biakan mikroorganisme uji secara melintang di bagian tengah medium ADK di cawan petri. Potongan biakan *P. oryzae* diletakkan di sisi kanan dan kiri goresan mikroorganisme uji dengan jarak ± 2 cm. Pertumbuhan koloni *P. oryzae* diamati setiap hari selama 10 hari. Kemampuan penghambatan mikroorganisme uji dihitung menggunakan rumus:

$$THR_{dc} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%, \text{ dengan}$$

THR_{dc} , tingkat hambatan relatif (%) pada uji kultur ganda; R1, diameter pertumbuhan *P. oryzae* pada kontrol (mm); dan R2, diameter pertumbuhan *P. oryzae* pada perlakuan (mm) (Hartati *et al.* 2014).

Uji produksi senyawa volatil dilakukan dengan menangkupkan cawan petri berisi koloni *P. oryzae* ke atas cawan petri yang berisi koloni mikroorganisme uji. Pertumbuhan *P. oryzae* diamati dengan mengukur diameter pertumbuhan koloni *P. oryzae* selama 10 hari. Kemampuan penghambatan isolat khamir dan bakteri dihitung menggunakan rumus (Hartati *et al.* 2014):

$$THR_v = \frac{dk - dp}{dp} \times 100\%, \text{ dengan}$$

THR_v , tingkat hambat relatif (%) isolat khamir dan bakteri pada uji produksi senyawa volatil; dk, diameter *P. oryzae* pada kontrol (cm); dan dp, diameter *P. oryzae* pada perlakuan (cm).

Uji aktivitas kitinolitik dilakukan dengan menginokulasikan mikroorganisme uji pada medium agar-agar koloidal kitin (*colloidal chitin agar-CCA*) dan diinkubasi selama 48 jam. Jika ditemukan zona bening di sekitar koloni maka mikroorganisme uji mampu menghasilkan enzim kitinase yang dapat melisis kitin. Indeks kitinolitik dihitung dengan rumus (Hartati *et al.* 2014):

$$\Delta Y = \frac{y_2}{y_1}, \text{ dengan}$$

ΔY , indeks kitinolitik; y_1 , lebar koloni khamir (mm); dan y_2 , lebar zona bening di sekitar koloni (mm).

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Uji *in vitro* dilakukan menggunakan rancangan percobaan acak lengkap dengan 3 ulangan. Data peubah tingkat hambatan relatif pada uji kultur ganda, uji produksi senyawa volatil, serta pertumbuhan padi dianalisis ragam dan perlakuan yang berpengaruh nyata diuji lanjut dengan DMRT pada taraf nyata 5% menggunakan piranti SAS 9.1.

HASIL

Hasil isolasi dari daun *Digitaria* sp., *Pennisetum* sp., dan *Panicum* sp. diperoleh khamir *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., serta bakteri *Bacillus* sp. dan isolat PPY. Hasil uji hipersensitif, uji DPM, dan uji hemolisis menunjukkan bahwa *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., *Bacillus* sp., dan isolat PPY tidak berpotensi sebagai patogen pada tumbuhan maupun mamalia. Khamir dan bakteri tersebut tidak menunjukkan gejala nekrosis pada daun tembakau, tidak membentuk zona bening maupun zona hijau kecokelatan pada medium agar-agar darah, serta tidak menimbulkan gejala nekrosis dan pertumbuhan abnormal pada bibit padi.

Hasil uji pembentukan senyawa volatil menunjukkan bahwa *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., dan *Bacillus* sp. memiliki tingkat hambatan relatif tertinggi terhadap koloni *P. oryzae* (Tabel 1). Hasil uji kultur ganda menunjukkan bahwa isolat PPY bersifat antibiosis pada *P. oryzae* dibuktikan dengan adanya zona bening antara *P. oryzae* dan isolat PPY. *Bacillus* sp., *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., dan *Rhodotorula* sp. dapat menghambat pertumbuhan miselium cendawan *P. oryzae* (Gambar 1).

Hasil uji hiperparasitisme menunjukkan bahwa *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., dan *Candida* sp. dapat menembusi hifa *P. oryzae*. Infeksi *Rhodotorula* sp. menyebabkan hifa membengkak, *Cryptococcus* sp. menyebabkan hifa mengerut kemudian patah, dan *Candida* sp. dapat menembusi tanpa menyebabkan malformasi hifa. *Bacillus* sp.

menyebabkan hifa lisis. Khamir *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., dan *Candida* sp. dapat mendegradasi kitin yang dibuktikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar isolat tersebut pada medium CCA (Gambar 1).

PEMBAHASAN

Agens hayati memiliki beberapa mekanisme dalam aktivitas biokontrol, di antaranya mencegah kolonisasi patogen pada daun, menginduksi ketahanan tanaman kompetisi nutrisi dan ruang, menekan perkecambahan spora, mengurangi ukuran panjang tabung kecambah, dan memproduksi senyawa volatil. Agens hayati juga mampu menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan patogen (Dees *et al.* 2015).

Khamir dan bakteri yang diperoleh memiliki kemampuan antagonis yang berbeda. Khamir *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., dan *Rhodotorula* sp. dapat menghasilkan senyawa volatil yang menghambat pertumbuhan *P. oryzae*. *Cryptococcus magnus*, *C. curvatus*, dan *C. terreus* dapat menghasilkan senyawa volatil berupa *dimethyl disulfide* yang merupakan antifungi (Buzzini *et al.* 2005). *Candida intermedia* dapat menghasilkan senyawa volatil yang efektif menekan pertumbuhan *Botrytis cinerea* (Huang *et al.* 2011).

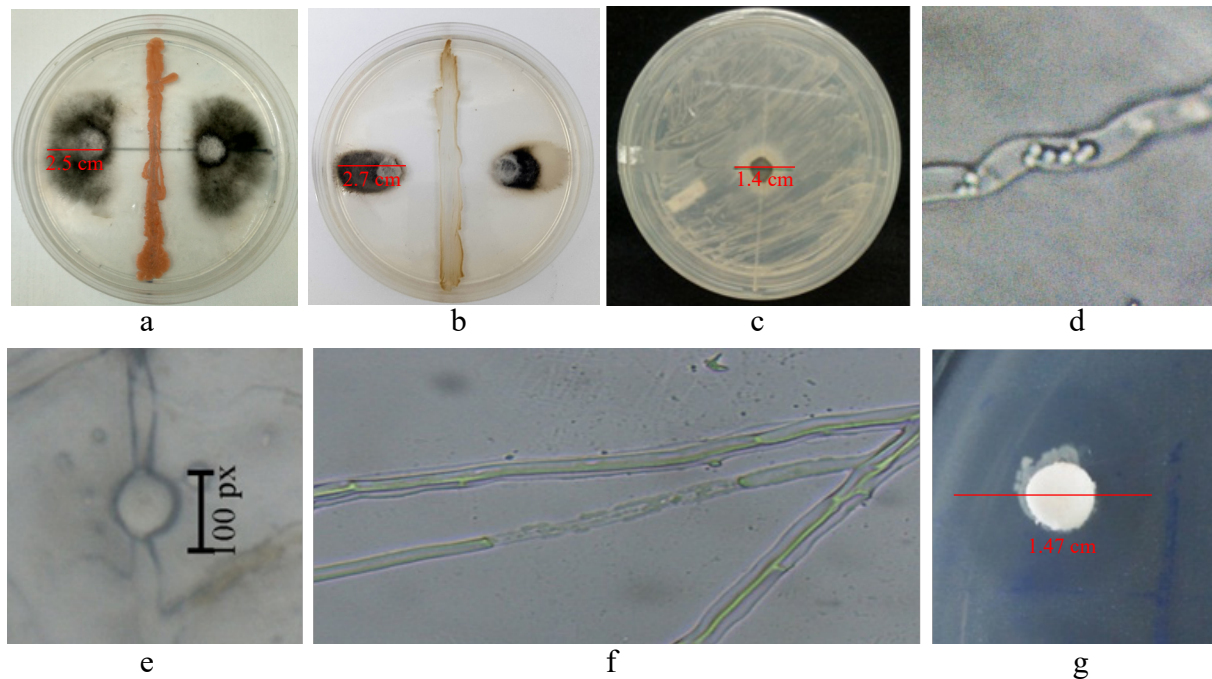
Selain itu, *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., dan *Rhodotorula* sp. dapat merusak hifa *P. oryzae* dengan hiperparasitisme dan menghasilkan enzim kitinase. *Candida krusei* ATCC 6258 dapat melekat pada *Fusarium guttiforme* dan menyebabkan hifa menjadi lebih kecil (Korres *et al.* 2011). *Candida*

Tabel 1 Mekanisme antagonis khamir dan bakteri terhadap *P. oryzae* secara *in vitro*

Isolat	THR _{dc} (%) ^a	THR _v (%) ^a	Hiperparasitisme	Indeks Kitinolitik
<i>Rhodotorula</i> sp.	13.09 c	23.64 c	+	2.93
<i>Cryptococcus</i> sp.	20.26 c	68.48 a	+	2.87
<i>Candida</i> sp.	19.46 c	53.33 ab	+	2.47
<i>Bacillus</i> sp.	34.51 b	40.61 bc	+	0.00
PPY ^b	53.97 a	-4.23 d	-	0.00

^aAngka yang diikuti huruf yang sama pada lajur yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan α 5%

^bBakteri epifit dari daun *Pennisetum* sp. pada medium YMA.



Gambar 1 Uji keefektifan mikroorganime uji. a, *P. oryzae* yang berada di dekat mikroorganime uji menjadi lebih tipis; b, *P. oryzae* tidak dapat tumbuh di sekitar isolat PPY; c, Diameter miselium *P. oryzae* lebih kecil daripada kontrol pada uji pembentukan senyawa volatil; d, *Candida* sp. menembusi hifa *P. oryzae*; e, *Rhodotorula* sp. menyebabkan hifa *P. oryzae* membengkak; f, *Bacillus* sp. menyebabkan hifa *P. oryzae* lisis; dan g, *Rhodotorula* sp. mendegradasi kitin yang ditunjukkan dengan adanya zona bening pada medium agar-agar koloidal kitin.

saitoana diketahui efektif mengendalikan *Botrytis cinerea* pada buah apel dengan menghasilkan enzim kitinase dan β -1,3-glucanase (El Ghaouth *et al.* 2003).

Bacillus sp. cukup efektif menekan pertumbuhan *P. oryzae* pada uji kultur ganda dan uji pembentukan senyawa volatil. Meskipun *Bacillus* sp. tidak menunjukkan aktivitas enzim kitinase pada medium CCA, tetapi *Bacillus* sp. dapat menyebabkan hifa *P. oryzae* lisis pada uji hiperparasitisme. *Bacillus amyloliquefaciens* memiliki potensi antagonis untuk mengendalikan *Botrytis cinerea* pada buah persik (Arrebola *et al.* 2010). *Bacillus subtilis* dan *Candida sake* terbukti efektif dalam menekan embun tepung (*Erysiphe betae*) dan bercak daun cercospora (Ziedan dan Farrag 2011).

Dapat disimpulkan bahwa *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., dan *Rhodotorula* sp. memiliki keefektifan tertinggi dalam menekan *P. oryzae* dengan beberapa mekanisme, yaitu menghasilkan senyawa volatil, hiperparasitisme, dan menghasilkan enzim

kitinase. *Bacillus* sp. cukup efektif dalam menekan *P. oryzae* pada uji kultur ganda dan uji pembentukan senyawa volatil, serta mampu melisis hifa *P. oryzae*. Diperlukan penelitian lanjutan untuk menguji keefektifan khamir dan bakteri tersebut dalam di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arrebola E, Sivakumar D, Bacigalupo R, Korsten L. 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.* 29:369–377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.001>.
- Buzzini P, Romano S, Turchetti B, Vaughan A, Pagnoni UM, Davoli P. 2005. Production of volatile organic sulfur compounds by basidiomycetous yeast. *FEMS Yeast Res.* 5:379–385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.011>.
- Dees MW, Lysoe E, Nordskog B, Brurberg MB. 2015. Bacterial communities associated

- with surfaces of leafy greens: shift in composition and decrease in richness over time. *AEM*. 81(4):1530–1539. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03470-14>.
- El Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *J Phytopathol*. 93(3):344–348. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.344>.
- Hartati S, Wiyono S, Hidayat SH, Sinaga MS. 2014. Seleksi khamir epifit sebagai agens antagonis penyakit antraknosa pada cabai. *J Hort*. 24(3):258–265. DOI: <https://doi.org/10.21082/jhort.v24n3.2014.p258-265>.
- Huang R, Li GQ, Zhang J, Yang L, Che HJ, Jiang DH, Huang HC. 2011. Control of postharvest botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*. 101(7):859–869. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0255>.
- Korres AMN, Buss DS, Ventura JA, Fernandes PMB. 2011. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. *Fungal Biol*. 115(12):1251–1258.
- Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. 1994. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 62:5154–5156.
- Munif A, Wiyono S, Suwarno. 2012. Isolasi bakteri endofit asal padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan. *J Fitopatol Indones*. 8(3):57–64. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.3.57>.
- Reflinur, Bustaman M, Widyastuti U, Aswidinnoor H. 2005. Keragaman genetik cendawan *Pyricularia oryzae* berdasarkan primer spesifik gen virulensi. *J Biotek Pert*. 10(2):55–60.
- Sucipto I, Munif A, Suryadi Y, Tondok EF. 2015. Eksplorasi cendawan endofit asal padi sawah sebagai agens pengendali penyakit blas pada padi sawah. *J Fitopatol Indones*. 11(6):211–218. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.11.6.211>.
- Suganda T, Yulia E, Widiyanti F, Hersanti. 2016. Intensitas penyakit blas (*Pyricularia oryzae* Cav.) pada padi varietas Ciherang di lokasi endemik dan pengaruhnya terhadap kehilangan hasil. *J Agr*. 27(3):154–159.
- Suryadi Y, Samudra IM, Priyatno TP, Susilowati DN, Lestari P, Sutoro. 2015. Aktivitas anticendawan *Bacillus cereus* 11UJ terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Pyricularia oryzae*. *J Fitopatol Indones*. 11(2):35–42. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.11.2.35>.
- Takagi M, Kaku K, Watanabe S, Kawai K, Shimizu T, Sawada H, Kumakura K, Nagayama K. 2004. Mechanism of resistance to carpropamid in *Magnaporthe grisea*. *Pest Manag Sci*. 60:921–926. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.896>.
- Yuliani D, Maryana YE. 2014. Integrasi teknologi pengendalian penyakit blas pada tanaman padi di lahan sub-optimal. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal*; 2014 Sep 26–27; Palembang (ID): PUR-PLSO Universitas Sriwijaya.
- Ziedan ESHE, Farrag ESH. 2011. Application of yeasts as biocontrol agents for controlling foliar diseases on sugar beet plants. *J Agr Tech*. 7(6):1789–1799.